



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

Preferencia de pareja condicionada por estimulación del
clítoris en la rata Wistar

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a
Miriam Betzabe Tecamachaltzi Silvarán

Comité Tutorial

Co-directores de Tesis

Dr. Genaro Coria Ávila

Dra. Margarita Martínez Gómez

Tutores

Dra. Estela Cuevas Romero

Dr. Jorge Rodríguez Antolín

Dra. Yolanda Cruz Gómez

Tlaxcala, Tlax.

Diciembre, 2011.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
TABLA 1.....	31
TABLA 2.....	44
TABLA 3.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.....	7
FIGURA 2.....	8
FIGURA 3.....	9
FIGURA 4.....	12
FIGURA 5.....	14
FIGURA 6.....	18
FIGURA 7.....	20
FIGURA 8.....	32
FIGURA 9.....	33
FIGURA 10.....	34
FIGURA 11.....	35
FIGURA 12.....	36
FIGURA 13.....	37
FIGURA 14.....	38
FIGURA 15.....	39
FIGURA 16.....	40
FIGURA 17.....	41
FIGURA 18.....	42
FIGURA 19.....	43

FIGURA 20.....	45
FIGURA 21.....	48
FIGURA 22.....	48
FIGURA 23.....	49
FIGURA 24.....	49
FIGURA 25.....	50
RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN.....	7
ANTECEDENTES.....	11
Conducta sexual de la rata.....	11
Condicionamiento Clásico.....	15
Condicionamiento clásico y formación de preferencias condicionadas.....	16
Formación de las preferencias de pareja.....	17
Preferencias de pareja condicionadas por recompensa sexual.....	19
Anatomía del Clítoris.....	21
Inervación del clítoris.....	21
Vocalizaciones ultrasónicas.....	22
JUSTIFICACIÓN.....	23
HIPÓTESIS.....	23
OBJETIVOS.....	24
Generales.....	24
Particulares.....	24
METODOLOGÍA.....	25

Experimento 1. Prueba de Preferencia de pareja condicionada por estimulación del clítoris.....	25
Animales y cirugías.....	25
Condicionamiento de pareja.....	26
Análisis de conducta sexual.....	27
Análisis estadístico.....	28
RESULTADOS.....	29
Experimento 1. Prueba de preferencia de pareja.....	29
Comportamientos apetitivos.....	32
Comportamientos precopulatorios.....	34
Comportamientos consumatorios.....	37
Experimento 2.Registro de vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz.....	46
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIONES.....	63
PERSPECTIVAS.....	64
BIBLIOGRAFÍA.....	65

RESUMEN

La recompensa es un estado subjetivo que depende del estado interno del individuo. La recompensa sexual es interpretada en el cerebro a partir de la intensidad y frecuencia de la estimulación genital. Esto significa que ritmos rápidos o pausados pueden tener efecto opuesto en la recompensa sexual, y por lo tanto en el deseo sexual y la reproducción. Por ejemplo, cuando una rata hembra controla la frecuencia de intromisiones de un macho al acercarse o alejarse, experimenta un estado de recompensa de suficiente intensidad para producir preferencias condicionadas de lugar y de pareja a través del condicionamiento Pavloviano. Adicionalmente, se ha mostrado que diferentes ritmos de estimulación en el clítoris (EClit) de la rata afecta la proceptividad y fertilidad, pero se desconoce si tiene un efecto recompensante que pudiera facilitar la formación de preferencia de pareja condicionada. El objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto de dos ritmos de EClit en la formación de preferencia de pareja condicionada. También se evaluó la frecuencia de vocalizaciones ultrasónicas (VU) durante el condicionamiento como un indicador de una respuesta incondicionada recompensante y durante la exposición a un olor artificial que funcionó como estímulo condicionado, como una manera de evaluar respuestas condicionadas de motivación.

Para los experimentos se utilizaron hembras de la cepa Wistar sexualmente inexpertas, de 200-250 g, ovariectomizadas, tratadas con benzoato de estradiol (10 µg/rata) y con progesterona (500 µg/rata), diluidos en 0.1 ml de aceite vegetal, e inyectados subcutáneamente 48 y 4 hrs. antes de las pruebas conductuales, respectivamente. Se formaron tres grupos (n=10). El grupo 1 recibió EClit cada 1 segundo, el grupo 2 recibió EClit cada 5 segundos y el grupo 3 no recibió estimulación, pero el vibrador utilizado se mantuvo prendido mientras las hembras se sujetaban en la misma postura que las de los grupos 1 y 2. La EClit se llevó a cabo

de manera intermitente, por un minuto, seguido de 1 min de descanso, durante 5 ciclos. Se usó la punta de un hisopo, adherido a un vibrador comercial el cual funcionó con 2 pilas AA y proporcionaba aproximadamente 4.5-5 vibraciones por mseg. Cada rata recibió un total de 10 sesiones de condicionamiento, una cada 4 días, en estado receptivo, asociando EClit en presencia de una gasa con olor a almendra. Las VU se contaron con un equipo “mini bat detector” durante el condicionamiento y durante la exposición al olor condicionado, Los resultados mostraron que la estimulación masiva del clítoris tiene un efecto sobre la proceptividad. Las hembras que recibieron estimulación masiva realizaron significativamente mayor número de sollicitaciones sexuales al macho, en comparación con el grupo de estimulación pausada. También se reportó que el grupo que recibió estimulación pausada del clítoris expresó más vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz en comparación con el grupo que recibió estimulación masiva y al grupo control.

Los resultados de este estudio sugieren que la EClit funciona como un estímulo incondicionado que evoca respuestas incondicionadas dependientes del ritmo al que se aplique. Sin embargo, ningún ritmo parece inducir respuestas condicionadas de preferencia de pareja. Discutimos las implicaciones.

INTRODUCCIÓN

El clítoris es un órgano presente en las hembras de los mamíferos. En la rata, como en la mayoría de las especies, solo la porción más superficial que representa la cabeza del clítoris es observable a simple vista (**Figura 1**). Gran parte de la literatura considera que la función del clítoris es en relación a la recompensa sexual. Sin embargo, datos recientes han mostrado que el clítoris también participa en la fertilidad y en la modulación del comportamiento sexual, dependiendo del ritmo con el que es estimulado. Por ejemplo, la estimulación del clítoris (EClit) aplicada con un vibrador de manera lenta o pausada puede facilitar la reproducción de las ratas sin afectar el comportamiento. Sin embargo, la EClit rápida o masiva incrementa la proceptividad de éstas sin afectar la reproducción, observado con mayor frecuencia de sollicitaciones dirigidas hacia el macho (Cibrián-Llenderal y cols. 2010). Este fenómeno también ha sido reportado en cerdas, pero el efecto en la reproducción y proceptividad parecen depender de ritmos opuestos a lo observado en ratas (Coria-Ávila y cols. 2009). Estos hallazgos sugieren que los ritmos lentos o rápidos de EClit se interpretan de manera diferente en el cerebro y pudieran desencadenar diferentes cascadas neuroendócrinas.

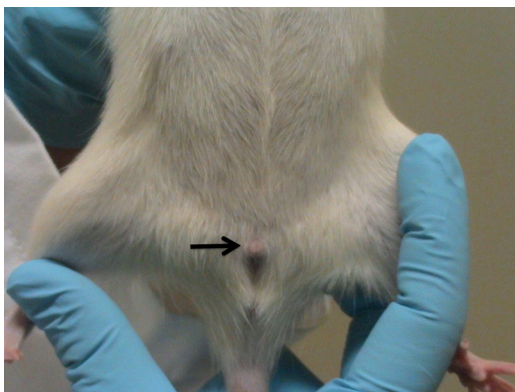


Figura 1. El clítoris de la rata. Solo se observa la porción más externa.

La importancia de los ritmos de estimulación rápidos o lentos ya ha sido mostrada previamente, aunque el concepto de “rápido” y “lento” sigue siendo relativo. Por ejemplo, para Cibrián-Llanderal y cols. (2010) la EClit se logra cuando el experimentador utiliza un dispositivo que vibra a una frecuencia de 4.5-5 Hz por milisegundo (**Figura 2**). Para producir la EClit rápida (o también llamada masiva) se “toca” una vez cada segundo el clítoris, mientras que para inducir la EClit lenta o pausada el clítoris se toca cada 5 segundos. Otros autores reportan el uso de un pincel pequeño, de tal forma que un pincelazo cada segundo, o cada 5 segundos resultarían en EClit rápida o lenta, respectivamente (Parada y cols. 2009).

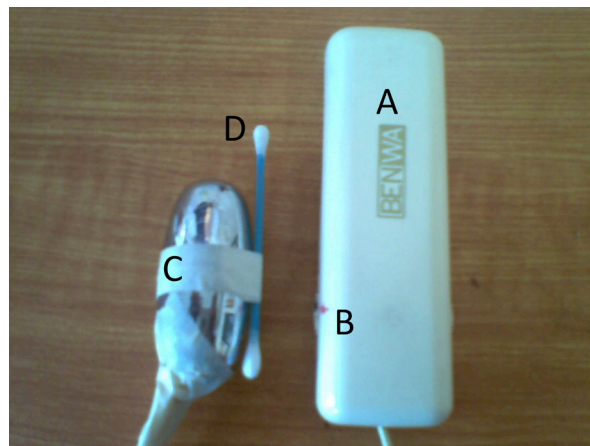


Figura 2. La estimulación artificial del clítoris (EClit) se logra con el uso de un vibrador (A). Una perilla (B) permite regular la intensidad de la bala vibratora (C). Un hisopo (D) permite “tocar” la porción externa del clítoris de la rata.

Con el modelo del pincel, Parada y cols. (2009) han reportado que la EClit pausada es más recompensante que la EClit masiva, pues con la primera se puede inducir preferencia de lugar condicionado (PLC). La prueba de PLC ha sido utilizada previamente para detectar los tipos de estímulos que son más recompensantes para las ratas. Ello se basa en que la rata asocie “lo que siente” con uno de los dos lados de una arena de PLC (**Figura 3**). Después de varias repeticiones, la rata “aprende” a preferir o evitar un lado por su asociación con un estímulo recompensante o aversivo, respectivamente (Tzschentke, 1998).

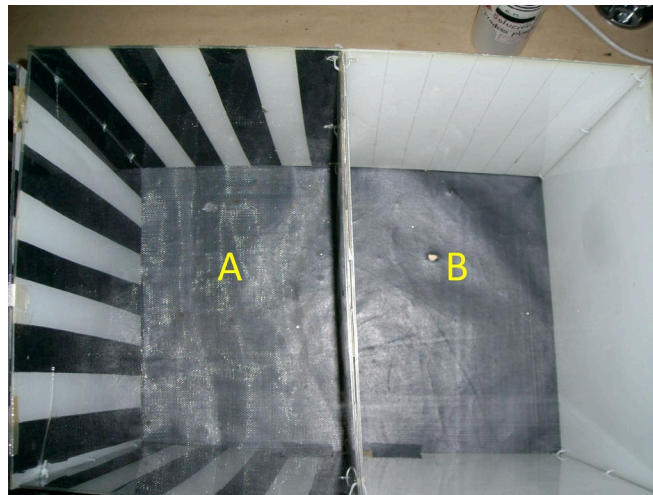


Figura 3. Caja de preferencia de lugar condicionado (PLC). Cuando una rata asocia un de los dos lugares con un estímulo recompensante aprenderá a preferirlo de manera condicionada por su posible relación con una memoria emocional.

Otros autores también han mostrado que los ritmos en la cópula son importantes para producir recompensa y preferencias condicionadas por asociación con dicha recompensa. Por ejemplo, si las hembras copulan en una arena donde ellas controlan el índice de contactos sexuales con el macho (*pacing* en inglés), experimentan un estado de recompensa que puede asociarse con alguno de los dos lados de una arena PLC y en pruebas futuras mostrará preferencia por el lado asociado (Paredes y cols. 1997; Coria-Ávila y cols. 2005). Además, las ratas que experimentan recompensa sexual en ese contexto con un macho impregnado de olor a almendra, mostrarán preferencia por machos con esencia de almendra en encuentros sexuales futuros. Comúnmente, las hembras demuestran su preferencia de pareja a través de un mayor número de solicitudes hacia el macho preferido, quien además es el primero en eyacular (Coria-Ávila, 2005, 2006).

En conjunto, estos datos indican que la estimulación genital pausada o masiva puede tener efectos diferentes en la recompensa sexual, y por lo tanto tener un efecto en el aprendizaje de la preferencia de pareja condicionada.

ANTECEDENTES

Conducta sexual de la rata

La ejecución de la conducta sexual ocurre como consecuencia de una sofisticada interacción de hormonas esteroides en el cerebro y mecanismos instintivos que dan lugar a patrones de respuesta sexual aparentemente automatizados (Pfaus y cols. 2001). Sin embargo, dichas respuestas son modificables a través del aprendizaje. En el caso de la rata de laboratorio, la conducta sexual se ha dividido en tres fases para su estudio, las cuales son la Apetitiva, Precopulatoria y Consumatoria.

La fase apetitiva comprende comportamientos que ocurren en ausencia de una pareja, como las vocalizaciones, la olfacción y la búsqueda de la pareja a través de señales (Pfaus y cols. 2001). Por lo tanto, a través de la medición de los comportamientos apetitivos pudiera inferirse el grado de motivación (o apetito sexual) de un individuo. Sin embargo, las arenas cilíndricas comunes limitan la expresión conductual de los animales durante la fase apetitiva. La siguiente fase es la precopulatoria, la cual ocurre en presencia de una pareja, y comprende comportamientos en los cuales la hembra se muestra proceptiva e invita al macho a copular con ella (Erskine, 1989). Entre estos comportamientos se encuentra la sollicitación (**Figura 4**), en la cual la hembra hace un acercamiento hacia el macho, seguido inmediatamente de una carrera corta y una pausa, lo cual motiva al macho para iniciar las montas (McClintock y cols. 1978). Por lo regular también se acompaña de movimientos rápidos de las orejas en el momento en que la hembra se detiene para esperar la monta del macho. Los comportamientos de sollicitación se pueden definir como esos comportamientos típicos de cada especie por medio de los cuales una hembra invita al macho a copular con ella y que regulan el patrón de

la cópula. Estos comportamientos ocurren antes del encuentro sexual, pero también entre una intromisión y otra durante la cópula. Sirven para señalar que la hembra está lista para copular. A través de ellos la hembra regula la sincronización de las intromisiones que recibe del macho (Erskine, 1989). Adicionalmente las hembras expresan proceptividad con los brincos y carreras cortas (*hops and darts*, en inglés). Los comportamientos de la fase precopulatoria son aquellos en los que se observa la “iniciativa femenina”. La sollicitación de cierta manera refleja el aspecto apetitivo más relevante de la conducta sexual (Erskine, 1989).

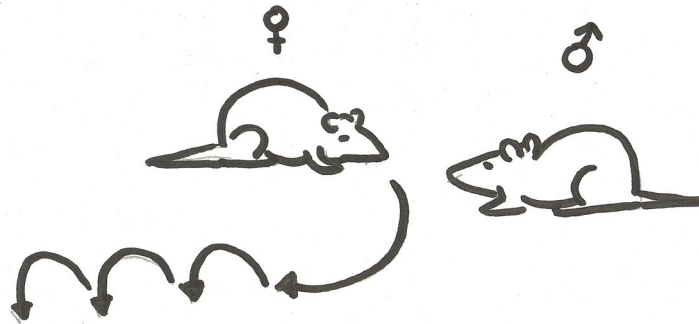


Figura 4. La sollicitación de las hembras representa una invitación al macho para copular. Comúnmente se observa como un acercamiento hacia el macho, seguido de una media vuelta y una pausa. A veces continúa con algunos brincos y carreras cortas (*hops & darts*).

La fase consumatoria, incluye la monta del macho sobre la hembra, la intromisión (inserción peneana intravaginal), y la eyaculación. En esta fase la hembra responde con la lordosis. En el macho, la conducta copulatoria involucra la interacción de tres componentes: un componente motor que determina la actividad coordinada de los músculos que participan en la monta y en la ejecución de movimientos pélvicos rítmicos alternantes sobre la parte posterior de la hembra; un componente genital externo que incluye respuestas vasculares y

musculares que determinan la erección y la inserción peneana intravaginal; y un componente genital interno que incluye la actividad secretora y contráctil de los diversos órganos que participan en la emisión seminal y en la eyaculación. La comprensión integral de la conducta copulatoria requiere información precisa de las interacciones que ocurren entre estos tres componentes. Las montas se caracterizan por la presencia de movimientos pélvicos durante los cuales el macho toca los flancos de la hembra mas no hay inserción del pene en la vagina. La intromisión (montas con inserción vaginal) se distingue conductualmente de las montas (sin penetración) por la presencia de movimientos pélvicos profundos seguidos de una desmonta violenta. Después de 7 a 10 intromisiones en promedio el macho eyacula (Beyer y cols. 1981). La eyaculación se caracteriza por movimientos pélvicos profundos (durante los cuales hay emisión del semen dentro de la vagina), seguidos de una desmonta lenta y un movimiento lateral de las patas delanteras. Ésta es seguida por un periodo de cuatro a ocho minutos que se conoce como periodo posteyaculatorio o refractario, durante el cual el macho no muestra ningún interés en copular con la hembra (Beyer y cols. 1981).

En el caso de la hembra, la lordosis ocurre normalmente con cada monta y se observa con una dorsiflexión, con elevación de la zona perineal y flexión de la cola hacia un lado, permitiendo al macho el acceso a la vagina. La lordosis se ha caracterizado en 3 tipos, dependiendo de su magnitud (**Figura 5**). Lordosis magnitud 1 (o de intensidad baja) que es una dorsiflexión en la cual la hembra mantiene la espalda recta. La lordosis magnitud 2 (de intensidad media) que se caracteriza por la elevación de la cabeza o de la grupa, y se ve un arqueamiento de la espalda. Finalmente la lordosis magnitud 3 (de intensidad alta), es aquella en la cual la hembra levanta tanto la cabeza como la grupa. Aunque la lordosis puede evocarse

de manera refleja con la estimulación de los flancos o de la piel perineal, se ha sugerido que también puede tener un componente voluntario. Por ejemplo, se ha observado que las ratas hacen lordosis de mayor magnitud cuando copulan con machos preferidos a los cuales también les solicitan más (Coria-Avila y cols. 2005, 2006).

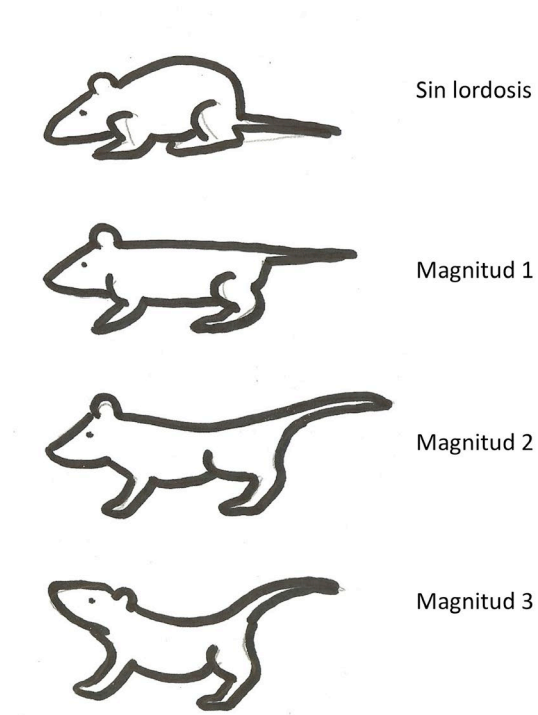


Figura 5. Diferentes magnitudes en la lordosis de la hembra.

Condicionamiento clásico

El condicionamiento clásico (Pavloviano) se basa en la relación entre un estímulo y la respuesta que induce en el organismo (E-R). Existen estímulos que naturalmente producen una respuesta fisiológica, a los cuales se les llama estímulos incondicionados (EI), y a la respuesta provocada por estos estímulos se le denomina respuesta incondicionada (RI). En el estudio clásico de Pavlov, el EI era comida, y la RI era la salivación de perros inducida por la comida en la boca. Una vez conocida la relación causal entre el EI y la RI se puede introducir otro estímulo diferente al incondicionado, el cual no produce una respuesta fisiológica por sí solo, por lo cual se considera un estímulo neutro (EN). Por ejemplo, el sonido de una campana en el estudio original de Pavlov. El EN se puede convertir en el predictor del EI y por lo tanto puede producir una respuesta similar a la RI. En consecuencia, el estímulo deja de denominarse neutro y pasa a ser un estímulo condicionado (EC) y la respuesta evocada por este se denomina respuesta condicionada (RC). Para que el fenómeno de condicionamiento se desarrolle es necesario que los eventos ocurran en cercanía temporal (contigüidad) y que el estímulo neutro siempre preceda al estímulo incondicionado (contingencia).

Los estímulos que producen condicionamiento pueden clasificarse principalmente en dos tipos: apetitivos y aversivos. Los estímulos apetitivos son aquellos que los animales buscan; por lo contrario los estímulos aversivos son aquellos que los animales evitan. Sin embargo, la apetitividad o la aversividad del estímulo puede cambiar dependiendo de factores como la privación y la saciedad del estímulo. Normalmente en condiciones de saciedad extrema, un estímulo apetitivo puede interpretarse como aversivo. Además, existen otros factores que afectan la asociación entre el estímulo y la respuesta E-R, por ejemplo, la intensidad natural del estímulo. Los estímulos débiles eventualmente pueden provocar habituación, en la cual la

asociación E-R se debilita después de presentaciones repetidas. Por el contrario, los estímulos fuertes pueden provocar sensibilización, la cual incrementa la fuerza entre la asociación E-R después de presentaciones repetidas. Ciertamente, en el análisis de la conducta sexual es importante considerar las operaciones de establecimiento y la posibilidad de habituación o sensibilización. Por ejemplo, un animal sexualmente saciado no se condicionará a estímulos sexuales. Además, la exposición a una misma pareja por periodos prolongados puede producir habituación sexual y las parejas nuevas pudieran ser más interesantes. Esto es mejor conocido como el efecto Coolidge. Por lo tanto, un individuo formará preferencia hacia una pareja cuando ésta se asocie con estímulos incondicionados apetitivos, y expresará la preferencia únicamente en condiciones en las que el individuo no esté saciado social y sexualmente.

Condicionamiento clásico y formación de preferencias condicionadas

El condicionamiento juega un papel protagónico en la toma de decisiones, tanto en humanos (Bray y cols. 2008), como en animales (Pfaus y cols. 2001). En humanos incluso se ha utilizado en la mercadotecnia para inducir las preferencias en las compras (Cruz & Pérez-Acosta, 2002). De hecho, la mayoría de las decisiones que tomamos a lo largo de nuestras vidas dependen del condicionamiento clásico, y un buen ejemplo son las preferencias que cada individuo desarrolla por una pareja o un lugar determinado, basado en la asociación con experiencias pasadas (Coria-Ávila y cols. 2008). El condicionamiento puede ocurrir como consecuencia del efecto de algunas sustancias como la cocaína (Lombas y cols. 2007), las anfetaminas (Nocjar & Panksepp, 2002), pero también por la comida (Jarros y cols. 2007), y por estímulos asociados al sexo (Camacho y cols. 2004).

Formación de las preferencias de pareja

A lo largo de nuestras vidas, tanto humanos como animales aprendemos a preferir lugares, objetos o individuos con los cuales experimentamos un estado de bienestar general, ya sea excitante o calmante, lo cual interpretamos como recompensa. Entre todo aquello que nos podría llevar a un estado de recompensa se encuentran la comida, la creación de vínculos afectivos y el sexo (Belaso, Estañol, & Juárez, 2008).

Se dice que se tiene una preferencia de pareja cuando un individuo tiene varias parejas potenciales para elegir, pero muestra selectividad hacia una de ellas para pasar más tiempo juntos, copular y/o tener cuidado biparental (Coria-Ávila, 2008). Con base en la duración de las preferencias y selectividad de una pareja, las especies se pueden dividir en monógamas o polígamas. La rata, se considera polígama, pues las preferencias de pareja que expresan son de corta duración y cambian constantemente. Sin embargo, a través del condicionamiento se puede lograr que un individuo en particular sea el preferido para iniciar las primeras cópulas. Dicha preferencia tendría implicaciones muy grandes en especies en las que ocurra competencia espermática y en las que el tiempo entre una cópula y otra sea decisiva en la fertilización de los óvulos (Coria-Avila y cols. 2004).

Existen algunos neuroquímicos que parecen modular las preferencias de pareja de manera natural en animales con tendencia monógama. Por ejemplo, la presencia de más receptores para oxitocina, vasopresina y dopamina (D2) en áreas como el núcleo accumbens y el pallidum ventral parecen facilitar la formación de preferencias de pareja en roedores del género *Microtus* (Young & Wang, 2004). Sin embargo, Los mismos neurotransmisores parecen facilitar el condicionamiento de pareja en animales polígamos (Coria-Ávila, Pfaus, Miquel, Pacheco, & Manzo, 2008). Normalmente, estos neurotransmisores modulan su

actividad durante aquellos procesos en los que se forman las preferencias de pareja como la cópula, o la cohabitación prolongada (Williams, Catania, & Carter, 1992). Sin embargo, el estrés ligero también facilita la formación de preferencias de pareja a través de la modulación de corticosteroides y dopamina (Devries, Gupta, Cardillo, Cho, & Carter, 2002), con lo cual se pudiera explicar los vínculos afectivos que se forman en el denominado síndrome de Estocolmo (Julich, 2005; Namnya y cols. 2008). Por lo tanto, la cópula, la cohabitación o el estrés ligero funcionan como estímulos incondicionados de suficiente intensidad como para inducir preferencia de pareja condicionada (**Figura 6**).

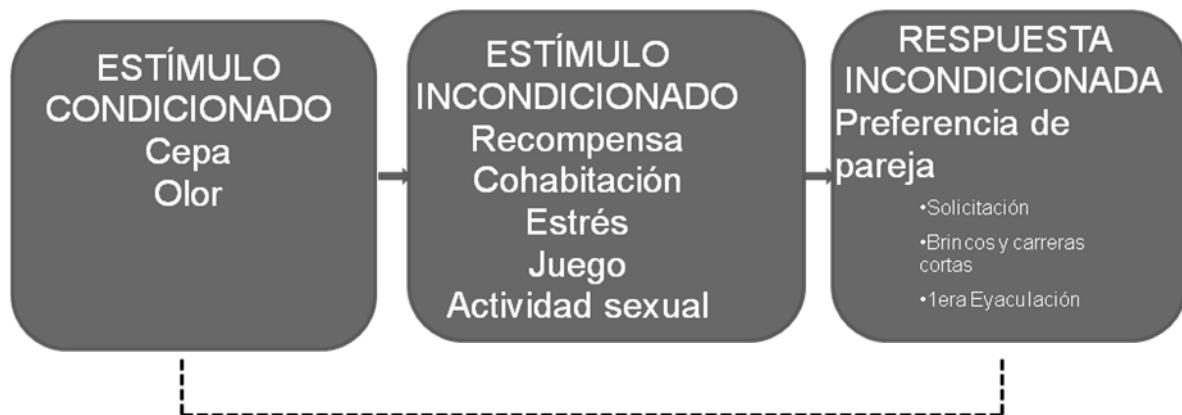


Figura 6. Condicionamiento clásico en la formación de preferencias de pareja.

Preferencias de pareja condicionadas por recompensa sexual

En la rata se ha demostrado que la asociación con recompensa sexual facilita la preferencia por una pareja. Coria-Ávila y cols. (2005, 2006, 2007) condicionaron a hembras que copularon con machos con un olor a almendra (que funcionaba como estímulo condicionado) en una arena de dos compartimientos, dividida por una pared media con orificios de un tamaño suficiente para que la hembra pudiera pasar de un lado a otro, pero que el macho, por ser de un tamaño mayor no pudiera hacerlo. Esto les permitía a las hembras controlar el ritmo de estimulación que recibían del macho. En días alternos la hembra copulaba en arenas sin división, en las cuales la hembra no controla la cópula, ya que el macho tenía libre acceso a ella; en esas sesiones la cópula ocurría con machos sin olor. Después de varias repeticiones las hembras fueron capaces de asociar el olor de almendra (estímulo condicionado, EC) con la posibilidad de controlar la cópula, lo cual les es recompensante (estímulo incondicionado, EI). La prueba final de preferencia de pareja se llevó a cabo en una arena de campo abierto, con dos machos atados en esquinas opuestas, uno con olor y otro sin olor. La preferencia de pareja se observó porque las hembras desplegaron un mayor número de comportamientos proceptivos (solicitaciones) hacia los machos con olor. Además, la mayoría de las hembras recibieron su primera eyaculación del macho preferido y expresaron lordosis de magnitud 3 frente a ellos. En un experimento posterior, Coria-Ávila y Pfaus (2007) demostraron que la activación cerebral (observada por la expresión de Fos) fue diferente en respuesta al olor de almendra en hembras condicionadas en comparación con las no condicionadas. Por ejemplo, en hembras condicionadas el olor a almendra provocó mayor expresión de Fos en la corteza piriforme, en el cíngulo, en el área preóptica media, en el hipotálamo ventromedial, en el núcleo paraventricular, y área ventral tegmental, entre otras.

Esto no ocurrió en hembras no condicionadas, lo cual indica que el mismo olor (i.e. almendra) indujo mayor actividad neural en áreas conocidas por su participación en la motivación sexual y toma de decisiones (**Figura 7**).

En conjunto, los experimentos anteriores demuestran la enorme influencia que la recompensa sexual por estimulación vaginocervical tiene en las preferencias de pareja. Hasta ahora se desconoce si la EClit pudiera inducir preferencias de pareja tan claras como las de la estimulación vaginocervical.

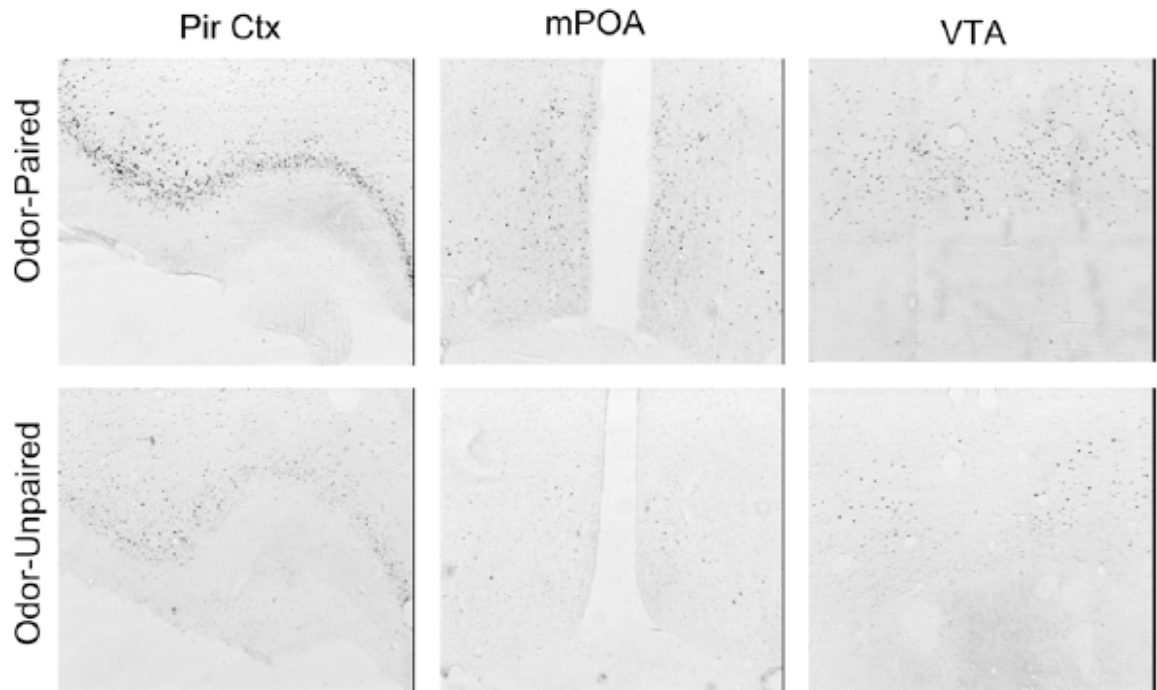


Figura 7. El condicionamiento produce cambios en la actividad cerebral. Se observa la inmunoreactividad a Fos en células de la corteza piriforme (Pir Ctx), área preóptica media (mPOA) y área tegmental ventral (VTA) de hembras condicionadas. Odor-paired representa al grupo que aprendió a asociar el olor de almendra con recompensa sexual. Odor-unpaired representa a hembras expuestas al olor pero nunca fue asociado con recompensa sexual. Tomado de Coria-Avila y Pfau (2007).

Anatomía del clítoris

El clítoris es un órgano presente en la anatomía femenina de los mamíferos. Éste órgano es una estructura multiplanar, vascularizado y sensible. Está formado por tejido eréctil y no eréctil, y se le puede dividir en tres porciones, cuerpo, raíces y glande, del cual solo la cabeza se encuentra expuesta (**Figura 1**). El cuerpo está formado por dos cuerpos cavernosos, que están unidos y parecen como una sola estructura. Tienen forma cilíndrica y su interior es como una esponja que se llena de sangre durante el estímulo sexual, al igual que lo hacen los cuerpos cavernosos del pene. Las raíces están formadas por dos cilindros que forman el cuerpo del clítoris, al llegar al hueso púbico se separan y amoldan a la forma de los huesos pelvianos, formando una "V" invertida (Aller, 2008).

Inervación del clítoris

El clítoris está inervado por la rama sensorial del nervio pudendo (Cruz y cols. 2004), la cual proviene del tronco L6-S1 (Martínez-Gómez, 1996; Cruz y cols. 2004) de la médula espinal, en la cual se ha encontrado que la estimulación de éste nervio activa neuronas en las laminas I, II, V, VI y VII, así como la parte central en la lámina X (Wiedey, Sipsky Alexander, & Marson, 2008; Joseph, Normandin, & Murphy, 2008). Inyecciones en el clítoris y vagina de un trazador trans-sináptico muestran que la información nerviosa pudiera afectar principalmente a la región dorsolateral del núcleo paragigantocelularis (nPGi) (Marson & Murphy, 2006), el cual se ha conceptualizado como la salida común final de los sitios supraespinales implicados en la conducta sexual, hacia las motoneuronas de la médula espinal que controlan los reflejos genitales. Se ha encontrado que éste núcleo comparte una vía directa con el área preóptica media (MPO) en ratas hembra (Marson & Foley, 2004). Y que en machos también existe una

vía indirecta a través de sus conexiones con la sustancia gris periacueductal (PAG), la cual envía información hacia el nPGi. Una vez en el nPGi la información se transmite al MPO, al núcleo paraventricular, al hipotálamo dorsal, posterior y lateral. Así como al núcleo base de la estría terminalis, la amígdala medial y PAG dorsal y lateral. Se ha reportado que la estimulación pausada del clítoris dada con un pincel fino activa el MPO en su porción medial y ventral y que tanto la estimulación masiva como pausada activan la Amígdala medial posteroventral (AMpv) (Parada y cols. 2010). Esto sugiere que la EClit pudiera tener efectos en el comportamiento y recompensa dadas sus vías neurales directas con áreas de integración y ejecución a nivel del sistema nervioso central (Joseph y cols. 2008).

Vocalizaciones ultrasónicas

Las vocalizaciones ultrasónicas pueden servir como indicadores conductuales del estado afectivo de las ratas (Knutson, Burgdorf, & Panksepp, 2002). En ellas se ha demostrado claramente la presencia de tres tipos vocalizaciones: de 22, 40 y 50 kHz. Las de 22 kHz han sido asociadas a estados negativos o de ansiedad en animales adultos (Brudzynski, Bihari, Ociepa, & Fu, 1993). Las de 40 kHz, se han estudiado en crías que son separadas de su madre (Miczek, Tornatzky, & Vivian, 1991). Sin embargo, las de 50 kHz han sido asociadas con estados afectivos positivos (Knutson y cols. 2002), las cuales son emitidas durante la fase apetitiva de la conducta sexual (Barfield, Auerbasch, Gueyer, & McIntoch, 1979). De igual manera, se ha reportado que son emitidas con mayor frecuencia ante la presencia de estímulos condicionados recompensantes (Knutson, Burgdorf, & Panksepp, 1999), por lo cual se ha sugerido que la emisión de vocalizaciones de 50 kHz se debe a la anticipación de la recompensa (Burgdorf, Knutson, & Panksepp, 2000).

JUSTIFICACIÓN

La estimulación del clítoris facilita la proceptividad, la fertilidad y la preferencia de lugar condicionada en hembras de mamífero. Sin embargo se desconoce si alguno de estos ritmos pueda facilitar la formación de preferencia por una pareja, que tenga señales condicionadas que predican dicha estimulación. Trabajos anteriores, en los cuales se explora el efecto de la recompensa sexual inducida por cópula controlada, han reportado que señales olfativas, como el olor a almendra, al estar presentes en un macho, inducen una preferencia de pareja. Dicha preferencia solo se presenta cuando el olor está asociado a cópula controlada. No obstante, se desconoce si algún estímulo al ser asociado a estimulación del clítoris tenga un efecto similar en la preferencia de pareja.

Para comprobar lo anterior sugerimos las siguientes:

HIPÓTESIS.

1. Las ratas despliegan preferencia de pareja hacia machos asociados a la estimulación masiva, pero no hacia los asociados con estimulación pausada.
2. Las ratas que reciben estimulación masiva expresan más vocalizaciones ultrasónicas de 50 KHz que las ratas que reciben estimulación pausada.
3. Un estímulo olfativo condicionado (olor a almendra) asociado a estimulación masiva induce más vocalizaciones ultrasónicas que cuando es asociado a estimulación pausada.

OBJETIVOS.

General:

- Determinar el efecto de la estimulación del clítoris sobre el condicionamiento en la preferencia de pareja.

Particulares:

- Analizar el comportamiento sexual de la hembra expuesta a dos machos: macho con olor asociado a estimulación del clítoris (pausada o masiva) y otro macho sin olor de asociación.
- Registrar vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz antes, durante y después de la estimulación del clítoris.
- Registrar las vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz durante la exposición a un estímulo olfativo condicionado a la estimulación del clítoris.

MÉTODOLOGÍA

El presente proyecto se llevó a cabo en un lapso de 2 años, mediante 2 experimentos los cuales se realizaron en el laboratorio de Neurociencias del Centro de Investigaciones Cerebrales de la Universidad Veracruzana.

Experimento 1. Prueba de Preferencia de pareja condicionada por estimulación del clítoris

Animales y cirugías

Para este experimento se utilizaron un total de 20 machos expertos sexuales de la cepa Wistar con un peso promedio de 300-350 g y 30 hembras Wistar con un peso promedio de 200-250 g., los cuales son mantenidos en condiciones de bioterio a una temperatura aproximada de $21^{\circ}\text{C} \pm 5$, con agua y alimento *ad libitum*.

El experimento requirió ovariectomizar a las hembras, las cuales fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina (50 mg/ml) y xilazina (4 mg/ml) en proporción 2:1, respectivamente, inyectando un volumen de 1 ml/kg de peso. Una vez anestesiadas las hembras fueron ovariectomizadas bilateralmente mediante una incisión lumbar, y terminada la cirugía se le administró vía subcutánea meglumina de flunixin 2.5 mg/kg y enrofloxacin 5 mg/kg, cada 24 h y durante tres días, como analgésico y antibiótico, respectivamente.

Todas las hembras tuvieron un periodo de recuperación postoperatorio de 1 semana. Para inducir la receptividad sexual se les administraron una dosis sistémica vía subcutánea de

Benzoato de estradiol 10 µg diluido en 0.1 ml de aceite vegetal, y progesterona 500 µg diluido en 0.1 ml de aceite vegetal, 48 y 4 horas antes de cada prueba respectivamente.

Condicionamiento de pareja

Se dividió a las hembras en 3 grupos (n=10), dos experimentales y un control. La estimulación del clítoris se llevó a cabo levantando a las hembras por la base de la cola y estimulando el clítoris de manera intermitente (ver Grupo 1 y Grupo 2), con la punta de un hisopo unido a un vibrador comercial, el cual, funciona con pilas AA y da una estimulación aproximada de 4.5 vibraciones por milisegundo, de acuerdo al cálculo obtenido con un polígrafo (**Figura 2**).

Grupo 1 Estimulación masiva.- Las hembras de este grupo recibieron una estimulación en el clítoris cada segundo (1/seg) durante 1 minuto. Pasado el minuto se dejaron descansar dentro de una caja para ratas, durante 1 minuto. Este proceso se repitió por un total de 5 veces.

Grupo 2 Estimulación pausada.- Las hembras de este grupo recibieron una estimulación en el clítoris cada 5 segundos (1/5seg) durante un minuto. Pasado el minuto se les dejó descansar durante un minuto dentro de una caja para ratas, este procedimiento se repitió 5 veces.

Grupo 3 Control.- Las hembras de este grupo son nuestro control, solo se les tomó de la cola durante un minuto, manteniéndolas en la misma posición en la cual fueron estimuladas las hembras de los grupos anteriores, mientras se mantuvo encendido el vibrador. Sin embargo, ellas no recibieron estimulación alguna. Pasado el minuto se les dejó descansar en una caja para ratas durante un minuto, este procedimiento se repitió 5 veces.

Las hembras fueron condicionadas cada 4 días por un total de 10 sesiones esto para que asociaran la estimulación del clítoris con un estímulo condicionado (olor de almendra). Se

utilizó esencia artificial líquida sabor almendra, incolora, marca DEIMAN®. En la sesión 1, 3, 5, 7 y 9 recibieron estimulación del clítoris y fueron expuestas a una gasa impregnada con la esencia de almendra. En las sesiones 2, 4, 6, 8 y 10 las hembras no recibieron estimulación alguna, solo se mantuvo encendido el vibrador y se sujetaron de la cola para mantenerlas en la posición de estímulo, y fueron expuestas a una gasa impregnada con solución salina.

En la sesión 11 se realizó la prueba de preferencia de pareja con 2 machos expertos sexuales. Uno con olor a almendra y el otro sin olor. La sesión fue video grabada y el análisis de conducta se realizó con el programa BOP (Cabilio, 1998) (Ver análisis de conducta adelante).

Análisis de la conducta sexual.

El total de la prueba de conducta sexual fue analizado por medio del Behavioral Observation Program (BOP) (Cabilio, 1998). Se midieron comportamientos como: sollicitaciones (**Figura 4**) (cuando la hembra se acerca al macho de frente y se aleja con una pequeña carrera curvilínea y hace una pausa inmediata para esperar la llegada del macho (Erskine, 1989), hops y darts (brincos y carreras cortas), lordosis (se observa como un arqueamiento de la espalda hacia arriba. Dependiendo de la intensidad de la misma se puede clasificar en magnitud 1, 2 o 3. En la magnitud 1 la espalda de la hembra permanece recta, en el tipo 2 la hembra puede levantar ya sea la cola o la cabeza, manteniendo la espalda recta y en el 3 se observan cabeza y cola levantadas) (**Figura 5**). También se analizaron las montas (se caracteriza por el ascenso del macho a la parte posterior de la hembra, estimulando sus flancos con las patas delanteras al mismo tiempo que realiza un movimiento pélvico, sin haber penetración vaginal); las intromisiones (el macho realiza el mismo comportamiento que en la

monta, sin embargo el movimiento pélvico es más intenso y hay penetración, también al desmontar el macho se retrae bruscamente), eyaculación (en este comportamiento el macho expulsa el semen, y se puede observar como abre las patas delanteras, el movimiento pélvico es menos intenso y más lento que en la intromisión, siendo la hembra la que se retira con un pequeño salto).

Análisis estadístico

Para la prueba de preferencia de pareja se analizó la conducta sexual de 10 hembras del grupo 1 (Estimulación masiva), 10 del grupo 2 (estimulación pausada) y 10 del grupo 3 (control). Y se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) multifactorial. En la cual el nivel de significancia para todas las comparaciones fue $P < 0.05$. Se realizó una prueba post hoc de Fisher (LSD) para las variables que en las que se encontraron diferencias significativas.

Para el análisis de las vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz se realizó un análisis de varianza para muestras repetidas a 10 hembras del grupo 1 (Estimulación masiva), 10 del grupo 2 (estimulación pausada) y 10 del grupo 3 (control). El nivel de significancia para todas las comparaciones fue $P < 0.05$. Se realizó una prueba post hoc de Fisher (LSD) para las variables que en las que se encontraron diferencias significativas.

RESULTADOS

Experimento 1. Prueba de preferencia de pareja

La tabla 1 muestra la media +/- el error estándar de las diferentes conductas evaluadas durante la prueba de preferencia de pareja condicionada.

Con respecto a las visitas, la prueba no detectó ningún efecto de grupo $F(2,50) = 3.19$, $P > .05$, de olor $F(1,50) = 3.19$, $p > .05$, ni interacción entre grupo y olor $F(2,50) = 3.19$, $P < .05$.

Con respecto a las investigaciones genitales la prueba no detectó efecto de grupo $F(2,50) = 0.70$, $P > .05$, de olor $F(1,50) = 0.00$, $P > .05$, ni en la interacción entre grupo y olor $F(2,50) = 0.72$, $P > .05$.

Con respecto a las solicitudes, la prueba detectó un efecto de grupo $F(2,50) = 3.19$, $P < .05$, pero no detectó efecto principal de olor $F(1,50) = 0.43$, $P > .05$, ni en la interacción entre grupo y olor $F(2,50) = 1.02$, $P > .05$.

Con respecto a los brincos y carreras cortas, la prueba no detectó ningún efecto de grupo: $F(2,50) = 2.17$, $P = 0.12$, de olor $F(1,50) = 0.14$, $P > .05$, ni interacción entre grupo y olor): $F(2,50) = 0.69$, $P > .05$.

Con respecto a las lordosis, la prueba detectó una tendencia en la interacción grupo-olor en lordosis magnitud 2 $F(2,50) = 2.54$, $P = 0.089$, pero no detectó efecto principal de olor $F(1,50) = 0.32$, $P > .05$, o de grupo $F(2,50) = 0.96$, $P > .05$.

Con respecto a las lordosis magnitud 1 la prueba no detectó efecto de grupo $F(2,50) = 0.53$, $P > .05$, olor $F(1,50) = 0.94$, $P > .05$, ni en la interacción entre grupo y olor $F(2,50) = 0.35$, $P > .05$.

Con respecto a las lordosis magnitud 3 la prueba no detectó efecto de grupo $F(2,50) = 1.30$, $P > .05$, olor $F(2,50) = 0.67$, $P > .05$, ni en la interacción entre grupo y olor $F(2,50) = 0.10$ $P > .05$. Con respecto a las montas la prueba no detectó efecto de grupo $F(2,50) = 0.22$, $P > .05$, olor $F(1,50) = 0.67$, $P > .05$, ni en la interacción entre grupo y olor $F(2,50) = 0.10$ $P > .05$.

Con respecto a las intromisiones la prueba no detectó efecto de grupo $F(2,50) = 0.11$, $P > .05$, olor $F(1,50) = 0.00$, $P > .05$, ni en la interacción entre grupo y olor $F(2,50) = 1.97$, $P > .05$.

Con respecto a las eyaculaciones la prueba no detectó efecto de grupo $F(2,50) = 0.36$, $P > .05$, olor $F(1,50) = 0.1.89$, $P > .05$, ni en la interacción entre grupo y olor $F(2,50) = 0.02$, $P > .05$.

CONDUCTAS SEXUALES DESPLEGADAS POR LAS HEMBRAS DURANTE LA PRUEBA DE PREFERENCIA DE PAREJA CON DOS MACHOS, UNO CON OLOR CONDICIONADO Y OTRO SIN OLOR						
CONDUCTAS	ESTIMULACIÓN MASIVA		ESTIMULACIÓN PAUSADA		CONTROL	
	Macho con olor condicionado	Macho sin olor	Macho con olor condicionado	Macho sin olor	Macho con olor condicionado	Macho sin olor
Visitas	17 ± 4.5	16.4 ± 3.9	19.3 ± 4.1	16.9 ± 3.2	17.2 ± 3.2	21.4 ± 3.8
Investigaciones genitales	7.7 ± 2.9	5 ± 1.5	6.0 ± 4.7	4.2 ± 2.3	5.0 ± 2.6	8.4 ± 3.0
Solicitaciones	10.2 ± 2.4 *	9.4 ± 3.2 *	7.7 ± 1.9	2.6 ± 0.6	5.9 ± 1.5	10 ± 1.8
Brincos y carreras cortas	13.8 ± 3.1	18.1 ± 5.9	10.3 ± 2.3	8.7 ± 2.0	8.0 ± 1.9	18.4 ± 3.5
Lordosis magnitud 1	0.7 ± 0.4	1.6 ± 0.6	1.3 ± 0.5	1.1 ± 0.6	1.2 ± 0.7	0.6 ± 0.2
Lordosis magnitud 2	4.7 ± 1.2	5.8 ± 1.6	8.5 ± 3.3	4.2 ± 1.3	3.1 ± 0.9	8.0 ± 2.0
Lordosis magnitud 3	1.5 ± 0.6	2.1 ± 0.9	1.6 ± 6.6	1.3 ± 0.6	0.8 ± 0.5	1.3 ± 0.6
Montas	3.1 ± 1.0	3.0 ± 0.7	3.1 ± 1.0	3.6 ± 1.1	1.8 ± 0.7	1.6 ± 0.6
Intromisiones	7.1 ± 1.5	6.8 ± 2.5	4.7 ± 1.6	2.6 ± 0.8	3.1 ± 0.8	3.4 ± 1.0
Eyaculaciones	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.2	2.5 ± 0.7	1.0 ± 0.3	0.8 ± 0.3	0.8 ± 0.3
LATENCIAS (SEG)						
Latencia a la primera visita	32.6 ± 14.6	37.6 ± 16.9	46.51 ± 24.3	89.78 ± 3.9	19.9 ± 8.5	22.8 ± 2.7
latencia a la primera investigación genital	475.4 ± 214.3	209.8 ± 41.6	941.5 ± 4.0	5451.5 ± 138.9	436.9 ± 92.5	87.1 ± 0.7
Latencia a la primera solictación	413.6 ± 193.7	375.6 ± 2.5	375.6 ± 193.7	238.5 ± 2.5	195.7 ± 199	199.0 ± 2.5
Latencia a los primeros brincos y carreras cortas	473.8 ± 246.4	435.7 ± 2.1	699.4 ± 79.7	233.6 ± 5.7	210.7 ± 45.2	73.9 ± 8.6
Latencia a la primera lordosis magnitud 1	1031.8 ± 171.1	1068 ± 134.3	1083 ± 59.3	1114.6 ± 4.5	948.1 ± 43.9	815.4 ± 11.1
Latencia a la primera lordosis magnitud 2	803.8 ± 2111.6	224.6 ± 166.8	475.8 ± 6.3	570.7 ± 84.7	342.9 ± 9.8	668.7 ± 50.9
Latencia a la priera lordosis magnitud 3	1031.8 ± 171.1	1145 ± 55.9	795.6 ± 108.4	941.5 ± 4.09	855.2 ± 46.7	1058.2 ± 5.2
Latencia a la primera monta	964.3 ± 175.3	423.6 ± 205.5	570.9 ± 84.7	759.9 ± 5.6	686.7 ± 50.9	486.4 ± 9.5
Latencia a la primera intromisión	803.6 ± 211.5	702.0 ± 191.6	399.3 ± 81.4	656.7 ± 61.4	413.5 ± 49.1	369.4 ± 9.3
Latencia a la primera eyaculación	1200 ± 0	1056 ± 145.8	639.9 ± 132.8	1083 ± 2.7	922 ± 617.6	1021 ± 0.45

Tabla 1. Media ± error estándar de las conductas desplegadas por las hembras durante la prueba de preferencia de pareja entre un macho con olor condicionado y otro sin olor. Tres grupos fueron comparados. En el grupo de estimulación masiva (n=10) se asoció un patrón de 1EClit / seg. con olor a almendra, en el grupo de estimulación pausada (n= 10) se asoció 1 EClit / 5 seg. con olor a almendra y en el grupo control (n= 10) se asoció la ausencia de EClit con olor a almendra. Todos los grupos tuvieron sesiones de contrabalanceo en las cuales se asoció la no estimulación con no olor. Los * indican diferencias significativas P < .05.

Comportamientos apetitivos

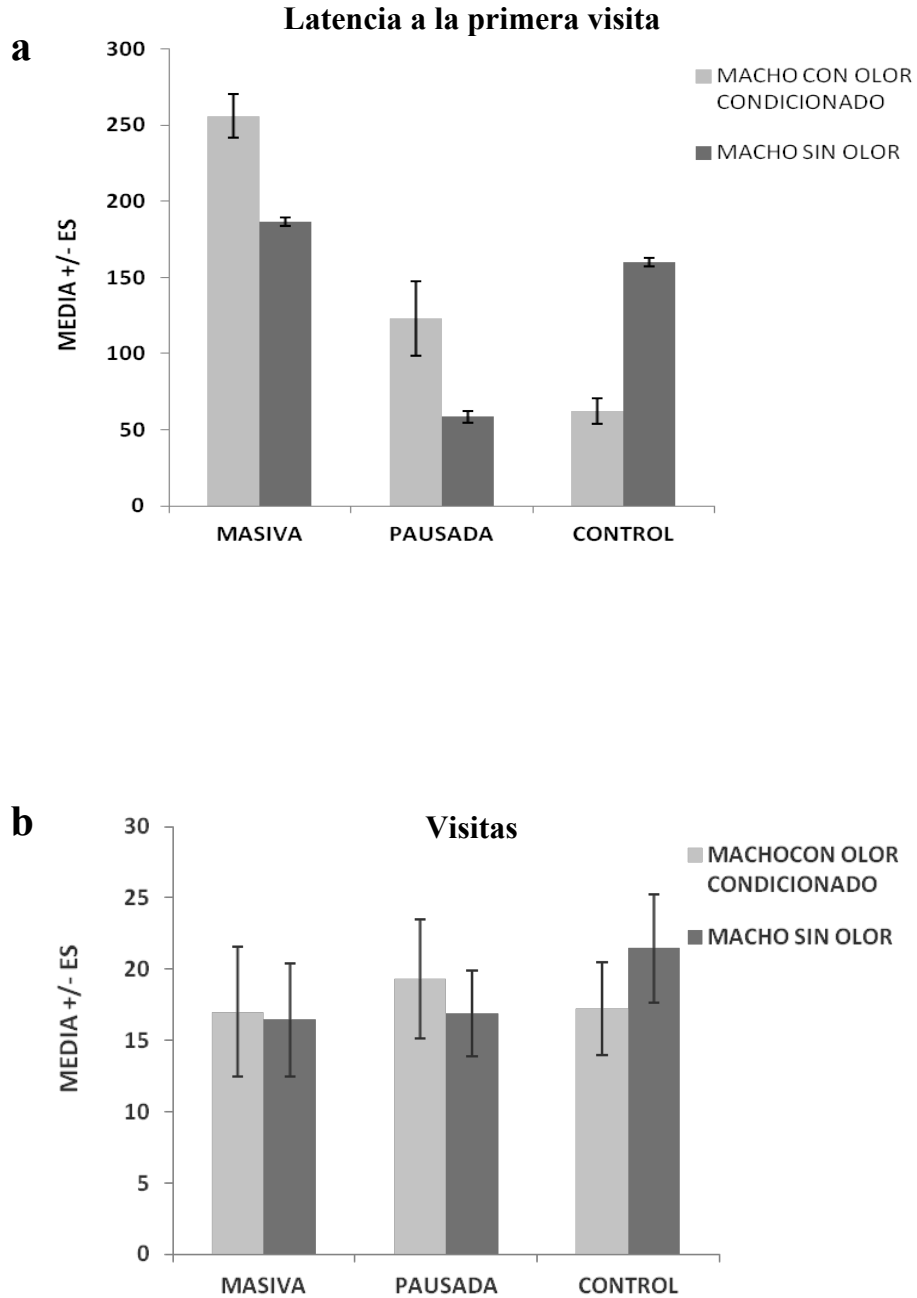


Figura 8. La gráfica muestra latencia y frecuencia de las visitas realizadas por las hembras a los machos durante la prueba de preferencia de pareja. **a** latencia de visitas y **b** frecuencia de visitas. El análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre los grupos ni en la interacción grupo-olor tanto en la latencia como en la frecuencia.

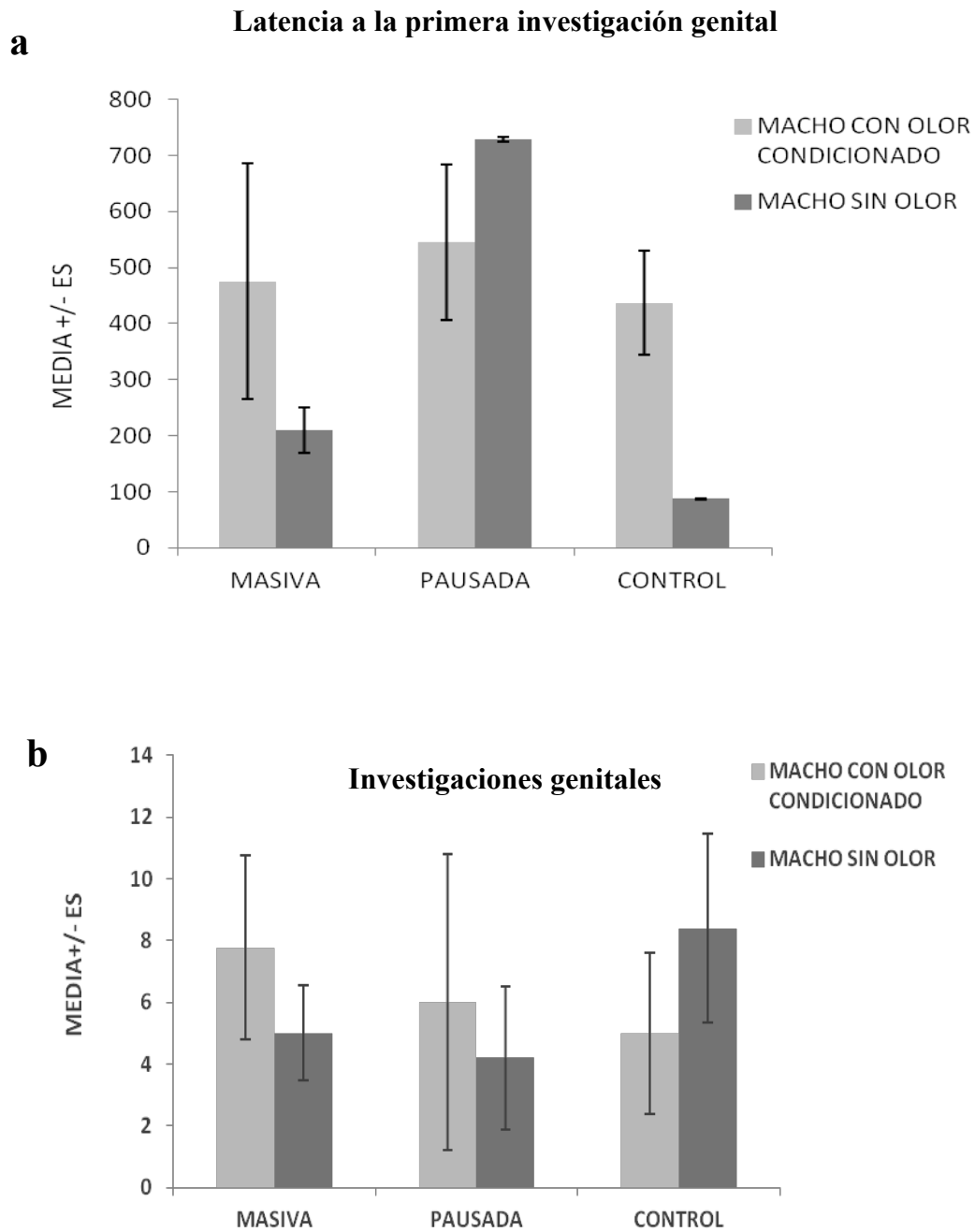


Figura 9. La gráfica muestra latencia y frecuencia de investigaciones genitales. **a** representa la latencia a la primer investigación genital y **b** la frecuencia de investigaciones genitales. El análisis estadístico no reveló diferencias significativas en la interacción grupo- olor, ni un efecto de grupo en ambos casos.

Precopulatorios

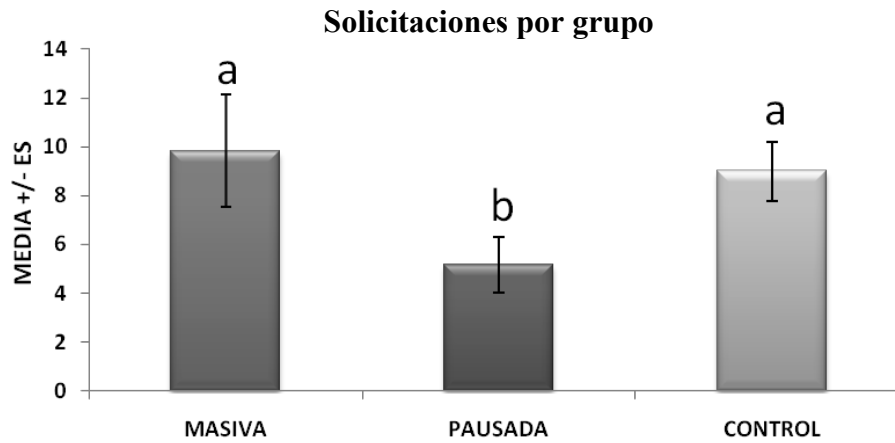


Figura 10. Frecuencia de solicitaciones por grupo. Se encontró un efecto de grupo. Las hembras del grupo masiva realizaron significativamente mayor frecuencia de solicitaciones en comparación con el grupo pausada. $F(2, 50) = 3.19, P < 0.05$. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Latencia a la primera solicitud

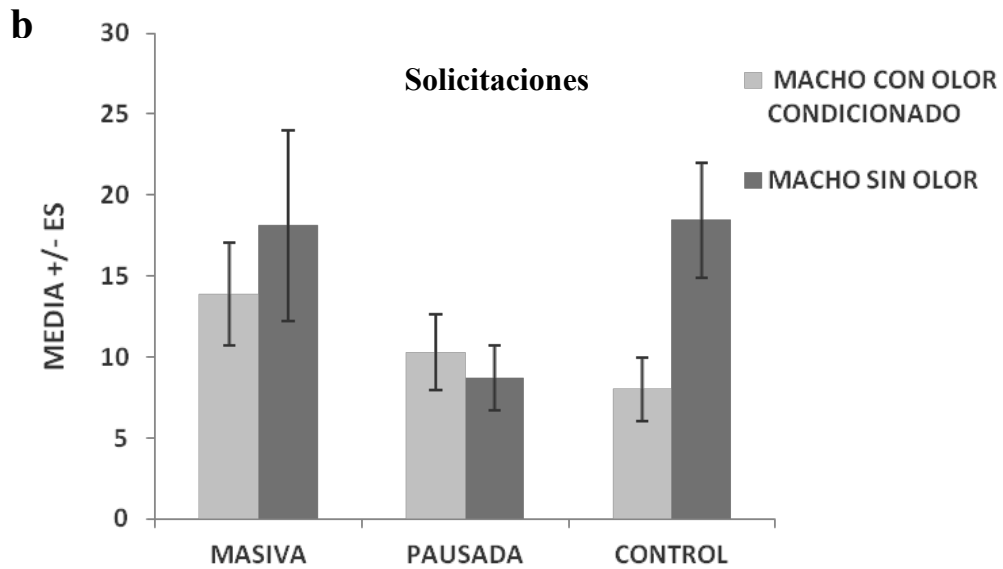
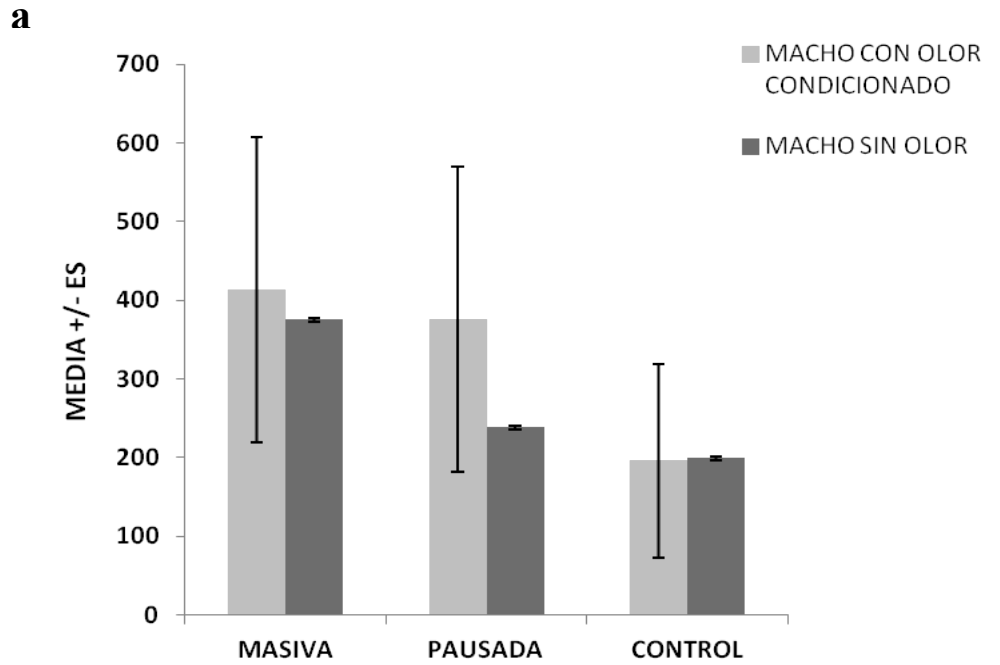


Figura 11. Latencia y frecuencia de solicitudes realizadas por las hembras hacia ambos machos. En las gráficas se muestra la interacción entre el grupo y el olor. **a** muestra la latencia a la primera solicitud y **b** la frecuencia de solicitudes. En ambos casos el análisis estadístico no reveló diferencias significativas.

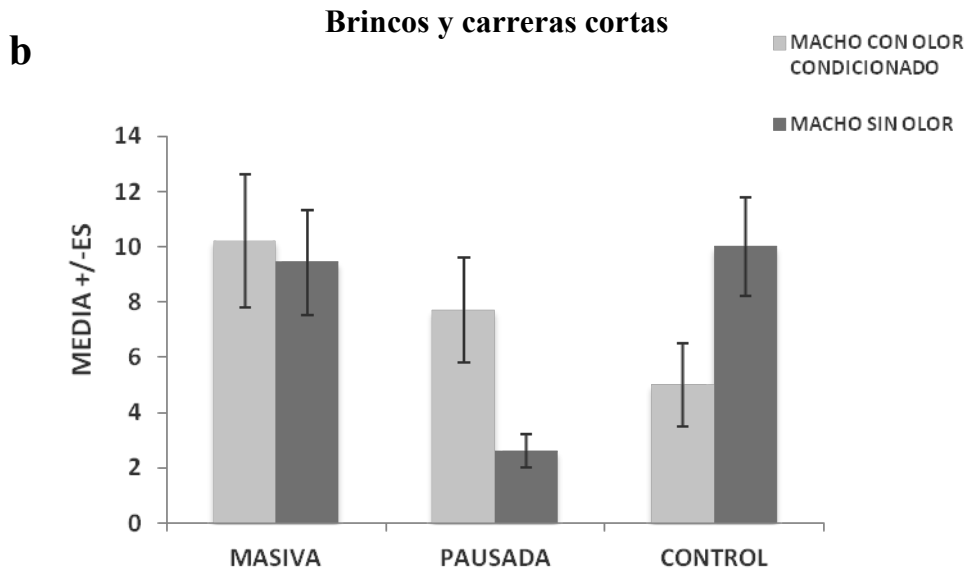
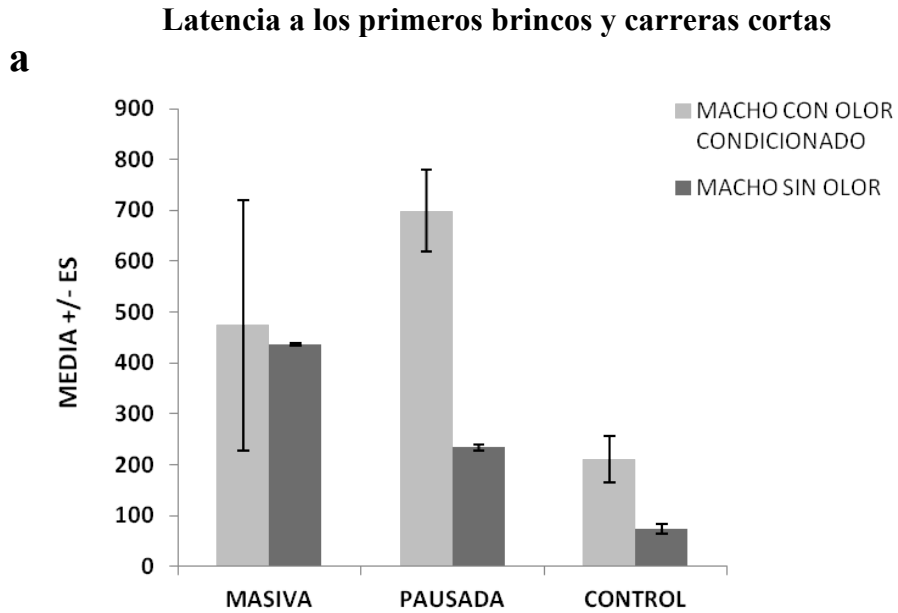


Figura 12. Latencia y frecuencia de los brinco y carreras cortas realizados por las hembras hacia ambos machos durante la prueba de preferencia de pareja. En la gráfica se muestra la interacción entre el grupo y el olor. **a** muestra la latencia a la primera solicitud y **b** la frecuencia de solicitudes. En ambos casos el análisis estadístico no reveló diferencias significativas.

Comportamientos consumatorios

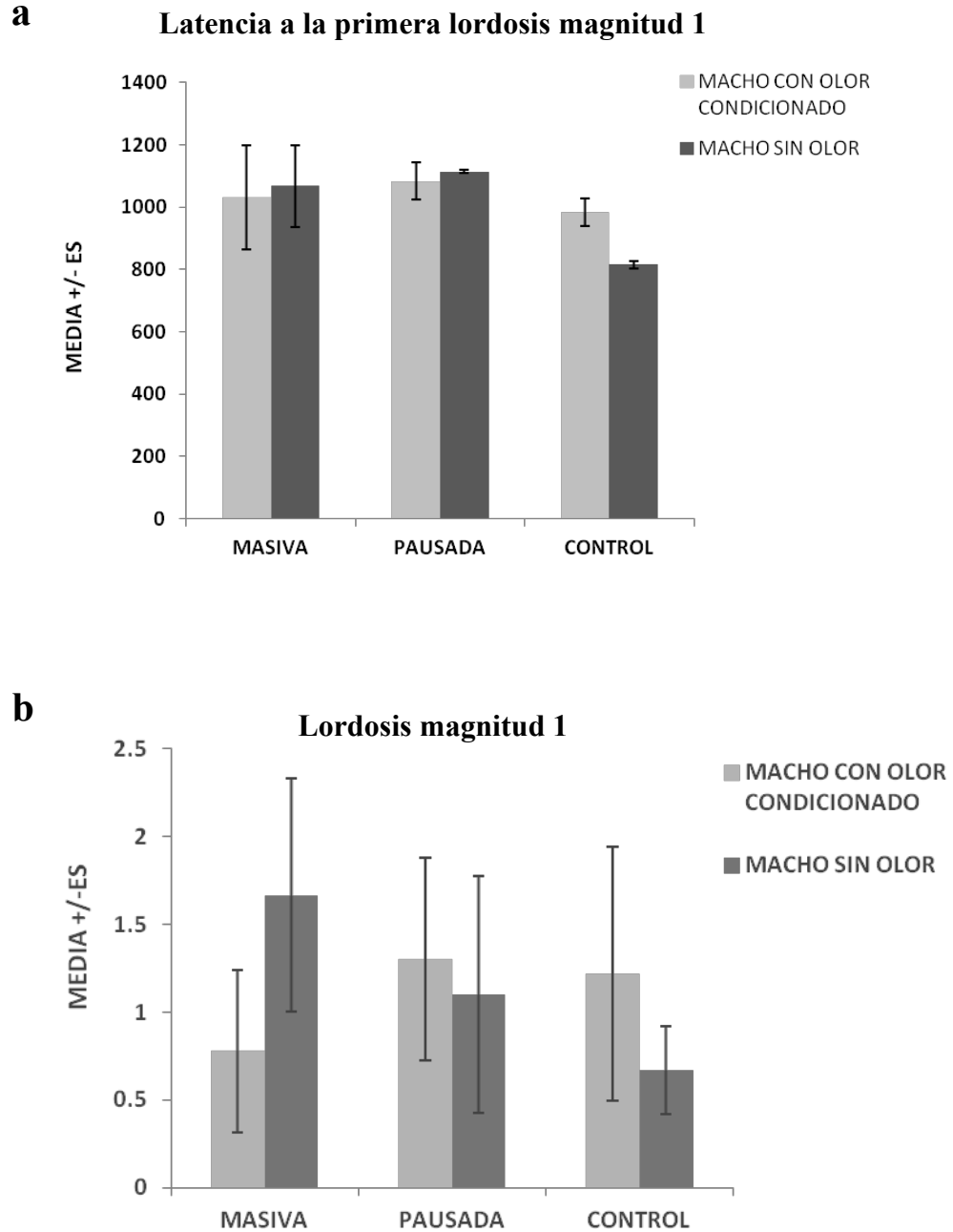


Figura 13. Latencia y frecuencia de las lordosis magnitud 1 realizadas por las hembras durante la prueba de preferencia de pareja. En las gráficas se muestra la interacción entre el grupo y el olor. **a** muestra la latencia a la primera solicitud y **b** la frecuencia de solicitudes. En ambos casos el análisis estadístico no reveló diferencias significativas.

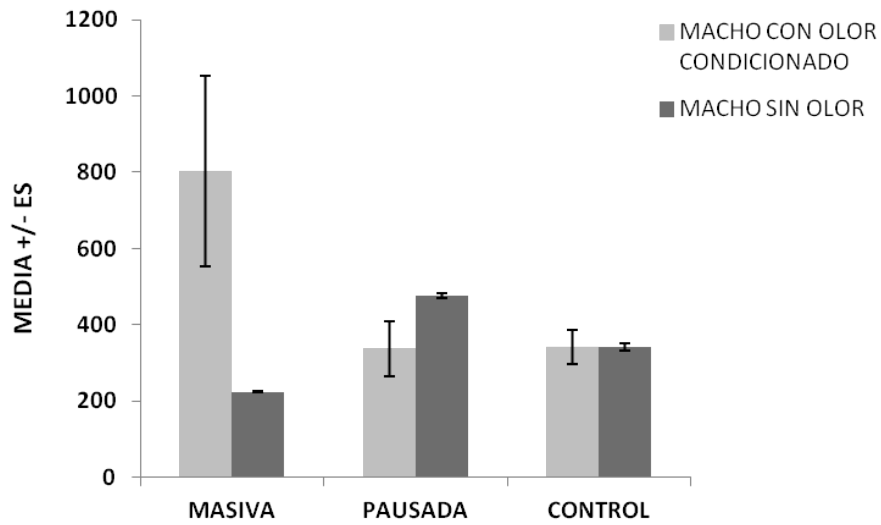
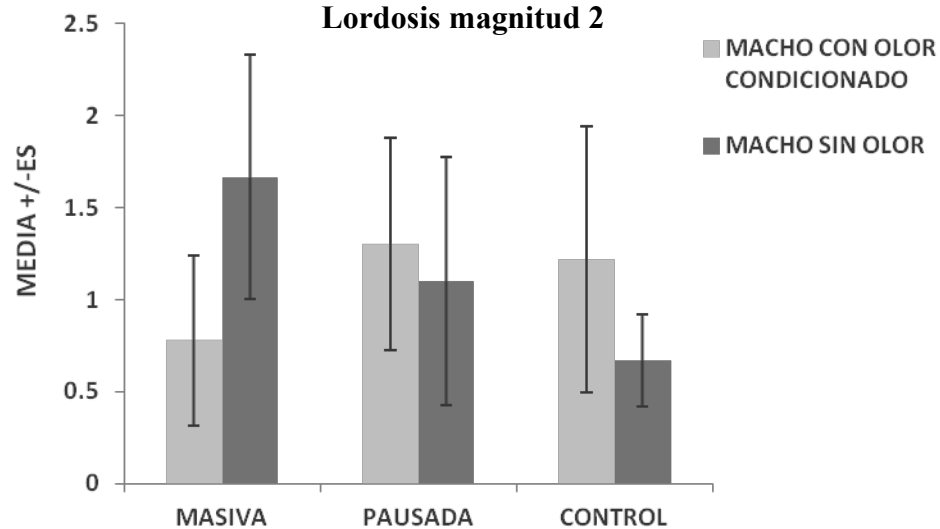
a**Latencia a la primera lordosis magnitud 2****b****Lordosis magnitud 2**

Figura 14. Latencia y frecuencia de las lordosis magnitud 2 realizadas por las hembras durante la prueba de preferencia de pareja. En las gráficas se muestra la interacción entre el grupo y el olor. **a** muestra la latencia a la primera solicitud y **b** la frecuencia de solicitudes. En ambos casos el análisis estadístico no reveló diferencias significativas.

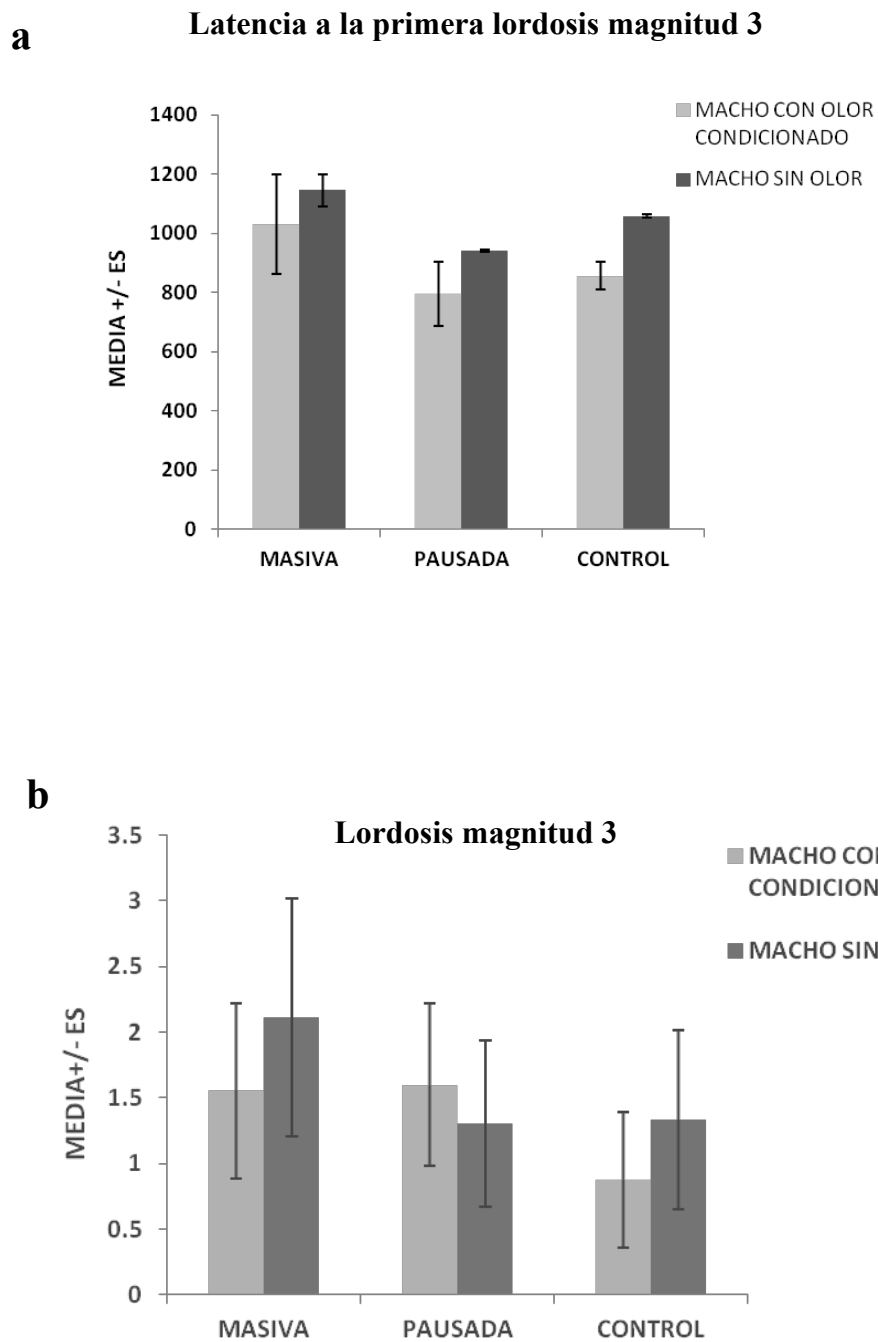


Figura 15. Latencia y frecuencia de las lordosis magnitud 3 realizadas por las hembras durante la prueba de preferencia de pareja. En las gráficas se muestra la interacción entre el grupo y el olor. **a** muestra la latencia a la primera solicitud y **b** la frecuencia de solicitudes. En ambos casos el análisis estadístico no reveló diferencias significativas.

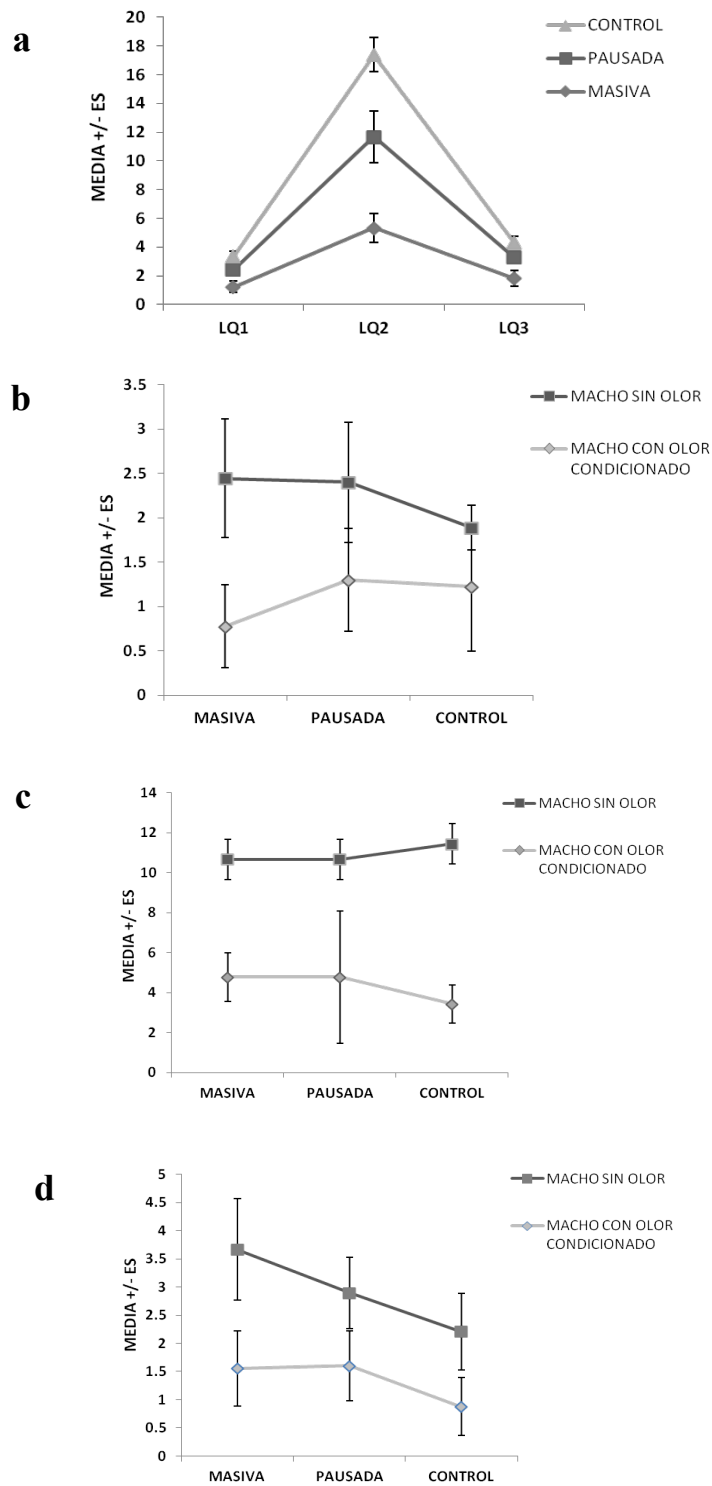


Figura 16. Efecto de la estimulación del clítoris en la conducta de lordosis. **a**: Muestra la magnitud de lordosis por grupo. **b**: Muestra el efecto de la estimulación del clítoris en la lordosis magnitud 1. **c**: Efecto de la estimulación del clítoris en las lordosis magnitud 2. **d**: Efecto de la estimulación del clítoris en la lordosis magnitud 3.

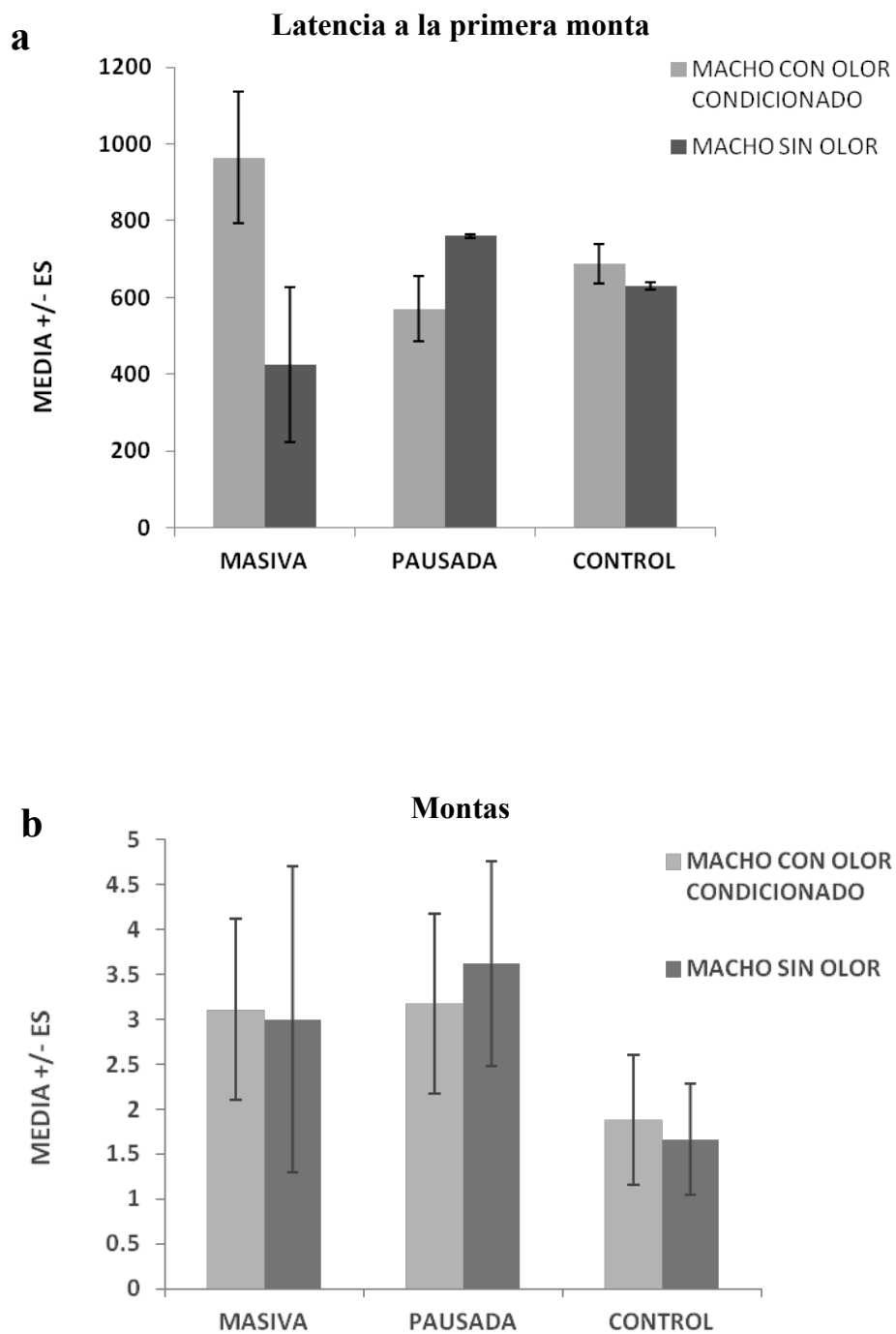


Figura 17. Latencia y frecuencia de montas realizadas por los machos durante la prueba de preferencia de pareja. En las gráficas se muestra la interacción entre el grupo y el olor. **a** muestra la latencia a la primera solicitud y **b** la frecuencia de solicitudes. En ambos casos el análisis estadístico no reveló diferencias significativas.

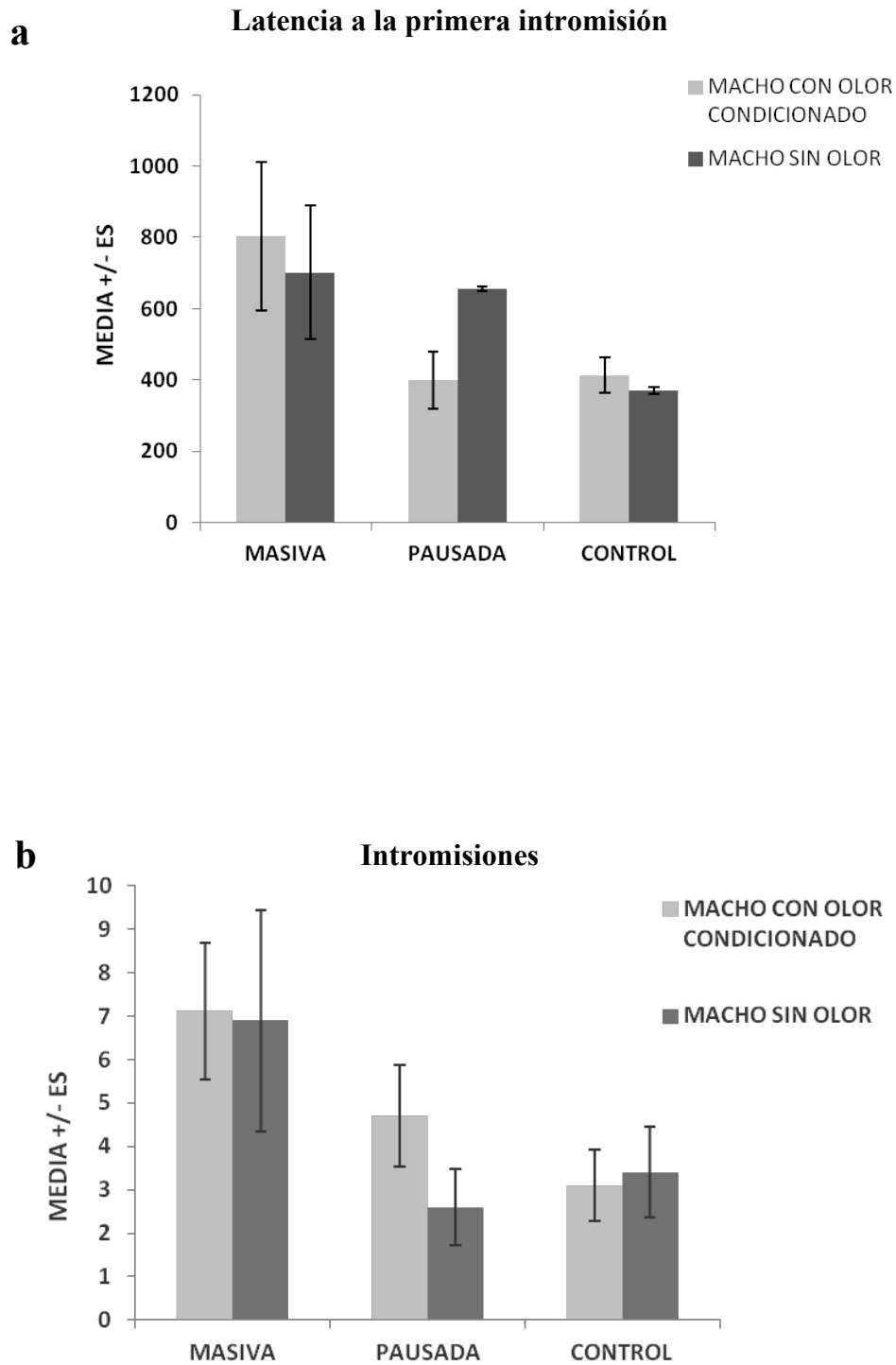


Figura 18. Latencia y frecuencia de intromisiones realizadas por los machos durante la prueba de preferencia de pareja. En las gráficas se muestra la interacción entre el grupo y el olor. **a** muestra la latencia a la primera solicitud y **b** la frecuencia de solicitudes. En ambos casos el análisis estadístico no reveló diferencias significativas.

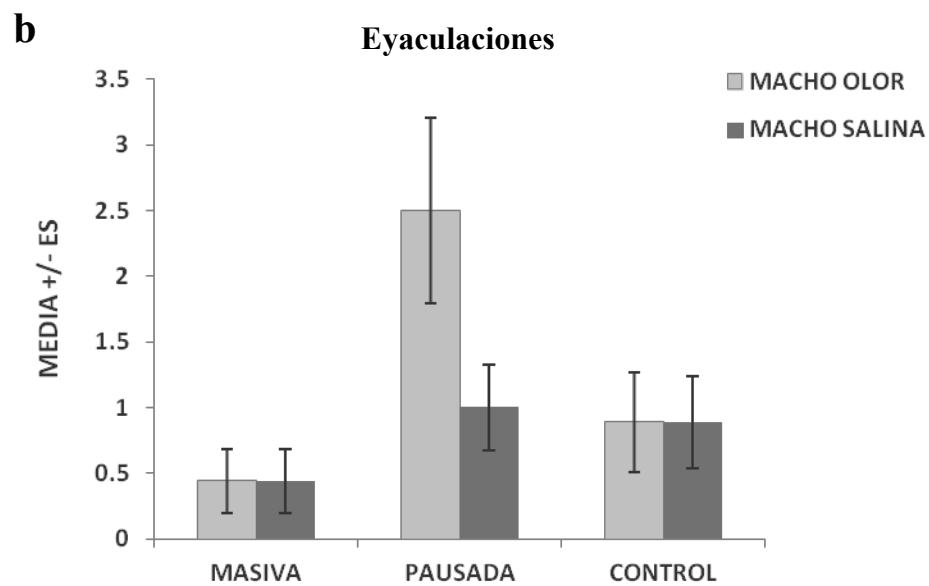
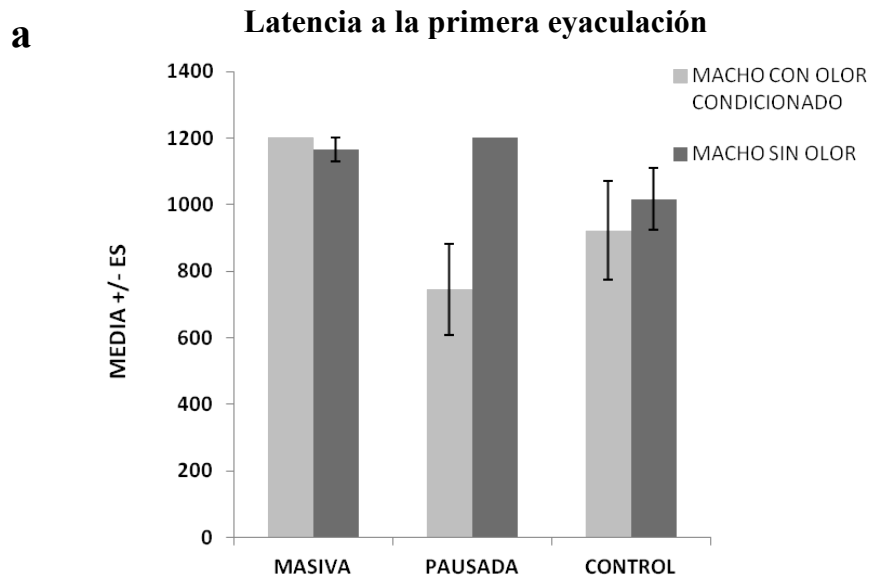


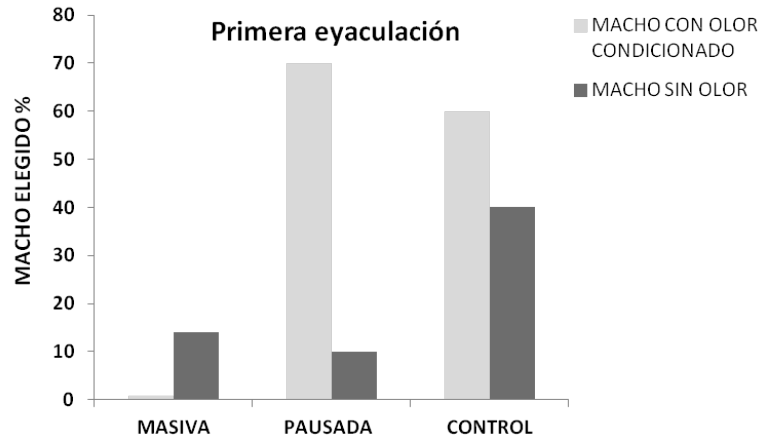
Figura 19. Latencia y frecuencia de eyaculaciones realizadas por los machos durante la prueba de preferencia de pareja. En las gráficas se muestra la interacción entre el grupo y el olor. **a** muestra la latencia a la primera solicitud y **b** la frecuencia de solicitudes. En ambos casos el análisis estadístico no reveló diferencias significativas.

Adicionalmente al análisis de las latencias y frecuencias se analizó el porcentaje y proporción de la primera, segunda y tercera eyaculación recibidas por las hembras durante la prueba de preferencia de pareja (tabla 2).

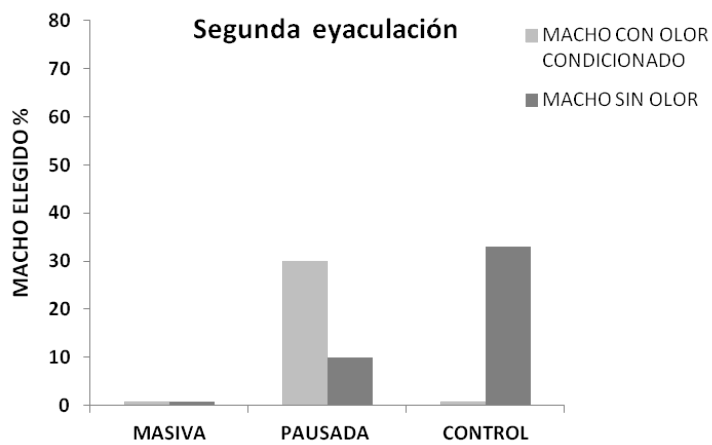
PORCENTAJE DE EYACULACIONES RECIBIDAS						
	PRIMERA EYACULACIÓN		SEGUNDA EYACULACIÓN		TERCERA EYACULACIÓN	
	Macho con olor condicionado	Macho sin olor	Macho con olor condicionado	Macho sin olor	Macho con olor condicionado	Macho sin olor
Masiva	0	0	0	0	0	0
Pausada	70	10	30	10	10	0
Control	60	40	0	33	10	0

Tabla 2. Muestra el porcentaje de eyaculaciones recibidas por las hembras durante la primera, segunda y tercera eyaculación. El cálculo del porcentaje se obtuvo dividiendo el total de eyaculaciones recibidas de cada macho, entre el total de hembras (incluidas las hembras que no recibieron ninguna eyaculación) multiplicado por 100.

a



b



c

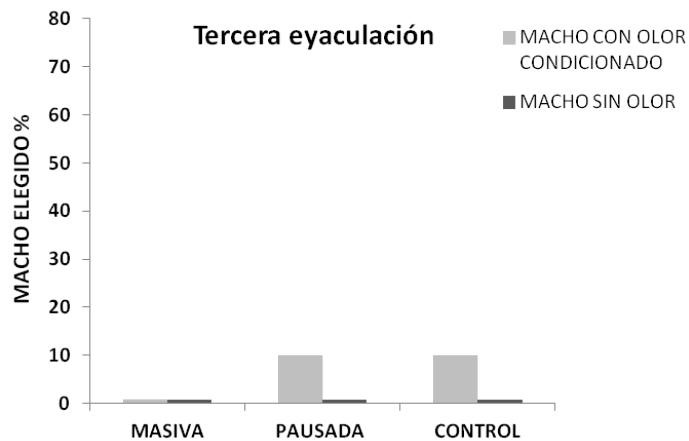


Figura 20. En las gráficas se muestra el porcentaje de eyaculaciones recibidas por el macho olor y no olor. Las hembras de estimulación pausada muestran una preferencia por el macho con olor condicionado para recibir su primera eyaculación. Las hembras de estimulación masiva no recibieron ninguna estimulación de ningún macho, las hembras del grupo control

Experimento 2. Registro de vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz.

Se registraron las vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz un minuto antes de la estimulación del clítoris, un minuto durante la estimulación del clítoris y un minuto después. Utilizando un detector de sonidos ultrasónicos Mini-3 BAT Detector ultrasound Advice. El equipo era portátil y permitía posicionarlo de manera fija a una distancia aproximada de 40 cm de la rata. Las vocalizaciones se grabaron y contabilizaron posteriormente con el audio.

Análisis estadístico

Se realizó una prueba de ANOVA para medidas repetidas que comparó la frecuencia de VU entre las 10 sesiones de condicionamiento y además entre los grupos. El nivel de alfa se consideró en 0.05.

Resultados

Las hembras de los grupos de estimulación masiva y pausada así como el grupo control, no realizaron vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz antes de la estimulación del clítoris, ni después de ella, así como tampoco en presencia del estímulo condicionado. Solo se registraron vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz durante la estimulación del clítoris. La ANOVA reveló que las hembras que recibieron estimulación pausada realizaron significativamente mayor frecuencia de vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz. en comparación con el grupo de estimulación masiva y el grupo control $F(2, 12) = 43.45$ $P < .05$. También se encontró una interacción grupo-sesión en el cual se observó que las hembras del grupo de estimulación

masiva y pausada realizaron mayor frecuencia de vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz en las sesiones 9 y 10 en comparación con el grupo control, el cual realizó más en la sesión 1 y 2. También las hembras del grupo de estimulación pausada realizaron significativamente mayor frecuencia de vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz en las sesiones 5 y 6 en comparación con los grupos de estimulación masiva y control. $F(18,108) = 7.41, P < .05$.

Aunado a lo anterior se encontraron diferencias significativas en las sesiones 3 y 6 principalmente en comparación con las otras sesiones $F(9, 108) = 7.55, P < .05$

VOCALIZACIONES ULTRASÓNICAS DE 50 KHZ.			
SESIÓN	ESTIMULACIÓN MASIVA	ESTIMULACIÓN PAUSADA	CONTROL
1	0 ± 0	4.2 ± 0.9	3 ± 0.5
2	0 ± 0	1.4 ± 0	4.4 ± 1.4
3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
4	2.2 ± 1.0	8.4 ± 2.7	0.6 ± 0.2
5	0.4 ± 0.2	9.4 ± 5.6	0 ± 0
6	0.4 ± 0.2	0 ± 0.4	1 ± 0.4
7	1.6 ± 0.5	1 ± 6.3	1 ± 0.4
8	1.4 ± 0.5	0 ± 0.4	0 ± 0
9	4 ± 0.7	6.6 ± 7.4	1 ± 0.3
10	3.2 ± 0.4	5.8 ± 5.3	0 ± 0
11	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Tabla 3. Media ± error estándar de las vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz durante el condicionamiento

Vocalizaciones por grupo

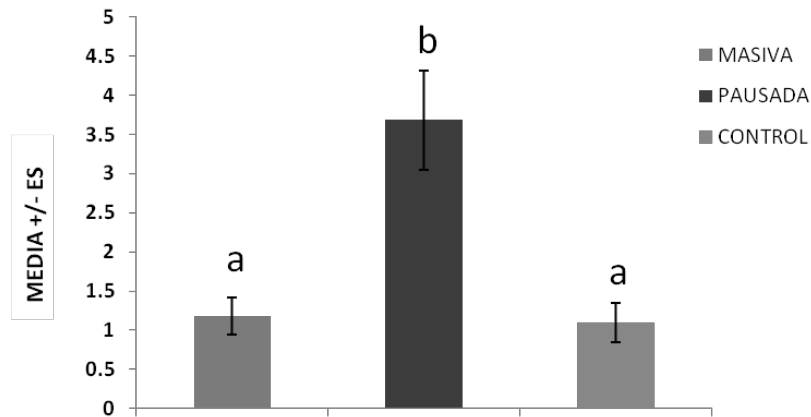


Figura 21. En la gráfica se muestra el efecto de grupo en las vocalizaciones ultrasónicas, en la cual se observa que las hembras de estimulación pausada realizaron significativamente mayor frecuencia de vocalizaciones en comparación con los grupos de estimulación masiva y control. $F(2, 12) = 43.45$ $P < .05$.

Interacción sesión - grupo

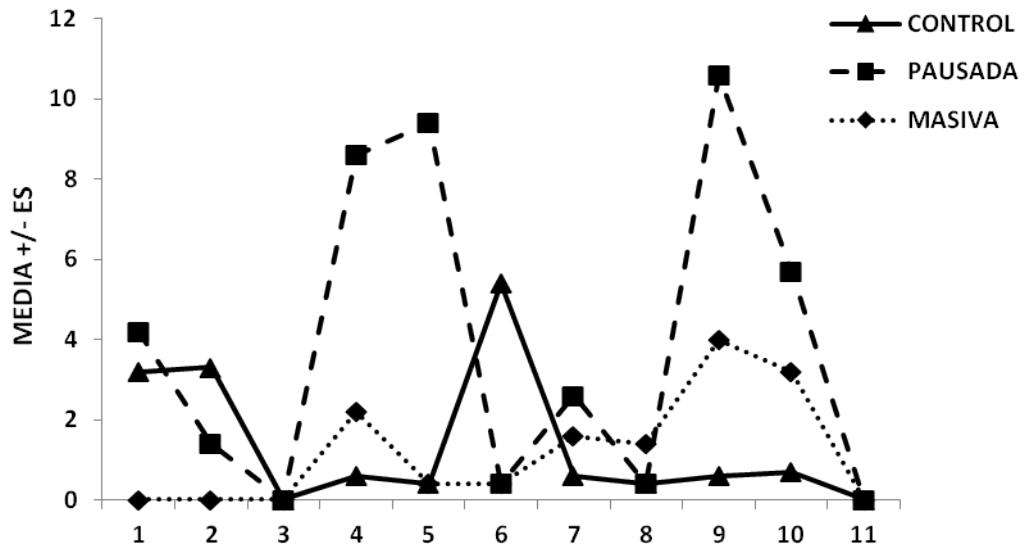


Figura 22. En ésta gráfica se muestra la interacción entre el grupo y el olor, en el eje de las X del 1 al 10 se muestran las sesiones de condicionamiento, la sesión 11 pertenece a la exposición al olor condicionado en la cual se registraron 0 vocalizaciones. Diferentes letras indican diferencias significativas. $F(18,108) = 7.41$, $P < .05$.

Vocalizaciones por sesión

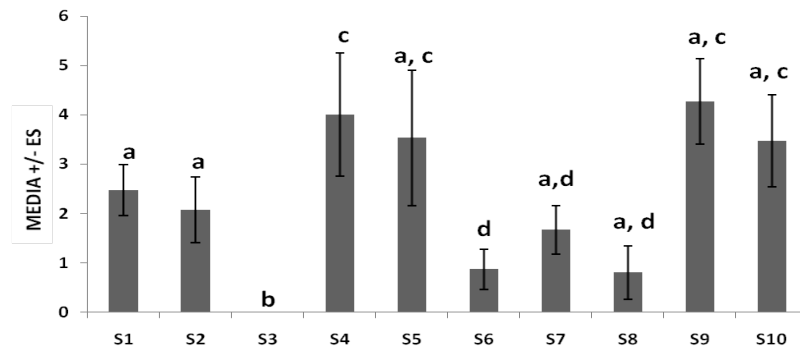


Figura 23. La gráfica muestra en el eje de las X las sesiones de condicionamiento. La prueba de ANOVA reveló diferencias significativas entre las sesiones, letras diferentes indican diferencias significativas, barras que comparten letras son iguales. $F(9, 108) = 7.55, P < .05$.

Vocalizaciones durante las sesiones de estimulación

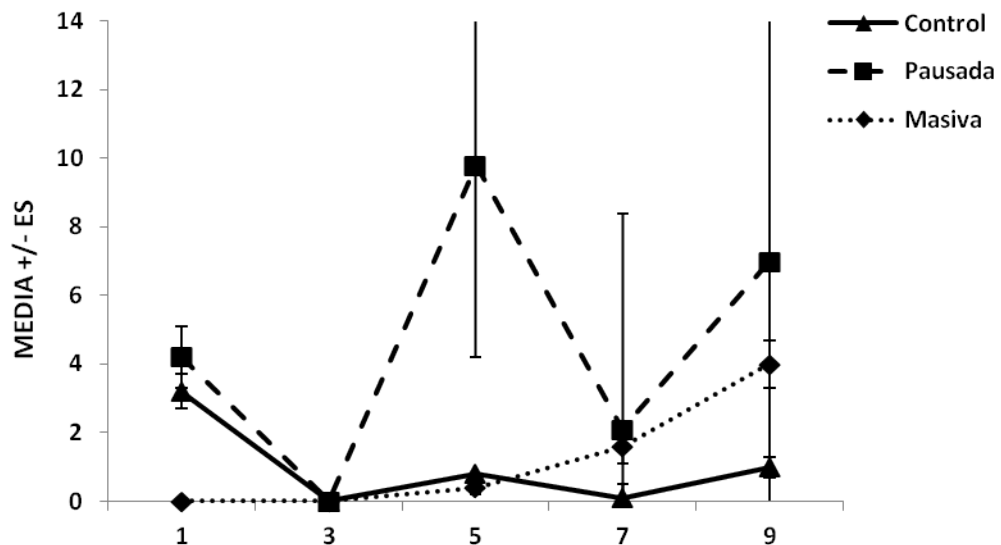


Figura 24. En ésta gráfica se muestra la interacción entre el grupo y el olor durante las sesiones de estimulación, en el eje de las x se muestran las sesiones de estimulación.

Vocalizaciones durante las sesiones de no estimulación

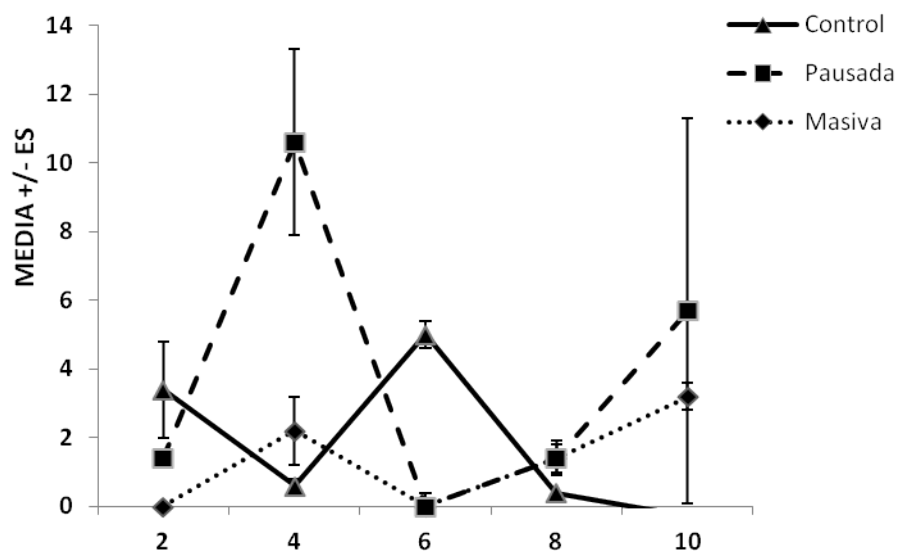


Figura 25. En las gráficas se muestran las vocalizaciones durante las sesiones de no estimulación.

DISCUSIÓN

Conducta sexual

Los resultados de esta tesis indican que la estimulación del clítoris a través de un vibrador de manera rápida o masiva tiene un efecto sobre el comportamiento sexual. Específicamente, incrementa el número de solicitudes que la hembra expresa hacia el macho con el que va a copular, en comparación con la estimulación pausada. Esto concuerda con lo previamente reportado por Cibrián-Llanderal y cols. (2010). Dichos autores realizaron un proceso de condicionamiento de 10 sesiones alternando estimulación /no estimulación a hembras vírgenes tratadas con estradiol y progesterona. Durante tal condicionamiento, fue utilizado un vibrador comercial para proporcionar los mismos patrones de estimulación masiva y pausada descritos en el presente estudio. Una vez terminado el condicionamiento, en la sesión 11 se realizó la misma estimulación del clítoris correspondiente a cada grupo, pero posteriormente se sometió a las hembras a una prueba de conducta sexual con un macho experto sexual, la cual tuvo lugar en una arena de cópula cilíndrica (Cibrián y cols. 2010; Tecamachaltzi-Silvarán 2011). Los autores reportaron que las hembras del grupo de estimulación masiva realizaron significativamente mayor frecuencia de solicitudes, en comparación con las hembras del grupo de estimulación pausada. Igualmente, Tecamachaltzi en 2011 realizó una prueba de preferencia de lugar condicionado, en la cual utilizó hembras vírgenes, tratadas con estradiol + progesterona; así como los mismos patrones de estimulación clitoriana masiva y pausada, aplicada con un vibrador comercial. En dicho trabajo se reportó que ni la estimulación masiva ni la estimulación pausada inducían una preferencia de lugar condicionado, aunque si hubo diferencias significativas en la frecuencia de solicitudes realizadas al macho en hembras

tratadas con la estimulación masiva. Los hallazgos anteriores concuerdan con los resultados del presente trabajo con respecto a la frecuencia de solicitudes. Ya que la estimulación masiva induce un aumento hacia ambos machos en comparación con la estimulación pausada. Aún así, no se encontraron diferencias significativas de esta frecuencia hacia ningún macho en particular, ni al macho con el olor condicionado (asociado a estimulación del clítoris en el pasado) o al macho sin olor. Por lo tanto, pareciera que las 10 sesiones de condicionamiento sensibilizaron la respuesta apetitiva de las hembras, dado que hay un aumento en las solicitudes, sin producir preferencia condicionada. Cabe mencionar, que en el grupo de hembras que recibió estimulación pausada la media de solicitudes fue mayor hacia el macho con olor condicionado, pero esto no alcanzó significancia estadística, por lo tanto, surge la duda si un tamaño de grupo mayor hubiera reflejado significancia. En tal caso, la estimulación pausada sería adecuada para producir una preferencia de pareja condicionada, expresada con solicitudes dirigidas hacia el macho preferido. También es importante resaltar que las hembras de estimulación pausada mostraron una preferencia para recibir la primera eyaculación del macho con olor condicionado. En el grupo de estimulación pausada el 70 % de las hembras recibieron su primera eyaculación del macho con olor y solo el 10 % recibieron la primera eyaculación del macho sin olor. Las hembras del grupo de estimulación masiva no recibieron ninguna eyaculación de los machos. Las hembras control recibieron el 60 % de eyaculaciones del macho con olor en comparación con el 30 % de eyaculaciones del macho sin olor. Éstos resultados nos pudieran estar indicando que las hembras del grupo de estimulación pausada prefieren al macho asociado a estimulación del clítoris, lo cual concuerda con lo reportado por Coria y cols (2005, 2006 y 2008). Trabajos en los cuales se reportó que las hembras que asociaron un estímulo con cópula controlada prefirieron al macho

asociado a dicho estímulo para recibir su primera eyaculación. Por otro lado Parada y cols (2011) han reportado que la estimulación pausada induce preferencia de pareja condicionada, sin embargo las hembras no muestran una preferencia para recibir la primera eyaculación del macho con olor. La estimulación pausada del clítoris aplicada con un vibrador podría estar teniendo un efecto similar al de la cópula controlada. Estudios previos han demostrado que la cópula controlada facilita el transporte espermático, la función luteal y una rápida terminación del estro (Coopersmith & Erskine, 1994). De manera similar la estimulación pausada del clítoris podría estar teniendo un efecto en la reproducción, que a su vez modula la preferencia de las hembras hacia el macho asociado a ésta.

Es interesante como la modulación de los ritmos de estimulación del clítoris provoca efectos diferentes en los animales, mientras Parada y cols (2010, 2011) reportan que la estimulación masiva aplicada con un vibrador induce preferencia de lugar condicionada, y una selectividad en las solicitudes hacia el macho con olor condicionado. Ellos no reportan un efecto en la proceptividad, ni una preferencia de las hembras, para recibir la primera eyaculación del macho con olor condicionado. Resulta pertinente, evaluar las diferencias entre las metodologías utilizadas en ambos trabajos. Debido a que los distintos resultados deben depender de ello. Parada y cols., en ambos trabajos utilizaron hembras pigmentadas de la cepa Long- Evans. Actualmente se ha reportado que existe una relación entre la hormona estimulante de los melanocitos y la conducta de solicitud. Algunos estudios hechos en ratas para explorar la fisiopatología del deseo sexual femenino, se han enfocado en comprender los mecanismos que incrementan las solicitudes (Pfaus, Shadiack, van Soest, Tse, & Molinoff, 2004). Por ejemplo, reportan que un análogo de la hormona estimulante de los melanocitos

(α -MSH) denominado PT-141 mostró un efecto en el deseo sexual al incrementar las sollicitaciones de ratas Long-Evans ovariectomizadas, tratadas con estrógenos o con la combinación de estrógenos + progesterona. Pfaus y cols. (2004) sugieren que la α -MSH podría ser uno de los tantos intermediarios del estrógeno. Ya que se ha reportado que, el estradiol incrementa los niveles de la hormona estimulante de los melanocitos en áreas hipotalámicas, asociadas con la conducta sexual femenina (Medina, Siddiqui, Scimonelli, Fenske, Wilson & Celis, 1998; Wilson, Thody, Hole, Grierson, & Cellis. 1991).

Dado que la α -MSH juega un papel importante en el incremento de las sollicitaciones, sería necesario reflexionar si las diferencias observadas entre los trabajos de Parada y cols (2010; 2011) y nuestro se deben a la diferencia entre las cepas. Puesto que las hembras pigmentadas Long-Evans pudieran tener mayor capacidad de incrementar la proceptividad en respuesta a la estimulación del clítoris en comparación con las hembras albinas Wistar utilizadas en el presente trabajo.

Es por ello que entender los efectos de los distintos ritmos de estimulación del clítoris sobre las sollicitaciones es interesante. Dado que la frecuencia de sollicitaciones en ratas es un indicador del deseo sexual y de la motivación (Pfaus y cols. 2004). También, se ha sugerido que las sollicitaciones están relacionadas directamente con el valor recompensante de la cópula. Entender los procesos que subyacen la evocación de las mismas hacia un macho, podría ayudar a comprender su papel en la selectividad de una pareja. Por ejemplo, otros autores han reportado que, cuando las hembras han asociado a un macho con cópula controlada, en comparación con cópula común muestran mayor número de sollicitaciones hacia

el macho asociado a cópula controlada (Coria-Ávila y cols. 2005). Por el contrario, también se ha reportado que las solicitaciones pueden ser reducidas selectivamente si las hembras asocian a un macho con la ausencia de recompensa sexual. Por ejemplo, si el receptor a opioides es bloqueado con naloxona (Coria-Ávila y cols. 2008). En base a lo anterior, se puede proponer que el efecto observado en el incremento de solicitaciones del grupo 1, nos podría estar indicando que dichas hembras tenían mayor motivación sexual al momento del encuentro con el macho, mientras que las hembras del grupo 2 tenían una motivación disminuida.

Una explicación posible para el efecto de la estimulación masiva o pausada sobre las solicitaciones sería en referencia a la saciedad sexual. Es decir, que las hembras del grupo 2 (estimulación pausada) experimentaran saciedad antes de la cópula, debido a ello al estar saciadas su motivación se vería disminuida. La saciedad es un mecanismo sumamente crítico para regular cualquier conducta. No obstante, no se considera inductor de recompensa. Varios autores han evaluado el efecto recompensante de la saciedad. Por ejemplo, Everitt y cols (1987) usaron la luz como estímulo para predecir la llegada de una pareja sexual. Ellos reportaron que la luz como un estímulo condicionado, solo es recompensante cuando el individuo no está saciado. Ya que, incrementa las respuestas instrumentales. Sin embargo, cuando el individuo está saciado, éstas disminuyen. Lo cual, podría explicar por qué en la estimulación pausada del clítoris, las solicitaciones se ven disminuidas. Esto se respalda con los datos de Cibrián-Llanderal y colaboradores (2010) quienes reportaron que en hembras gonadalmente intactas la estimulación pausada (como en grupo 2) incrementó los índices de fertilidad al copular con machos expertos sexuales. Aunque no incrementó los comportamientos proceptivos. Sí en hembras intactas la estimulación pausada incrementa la

fertilidad, es probable que sea a través de la modulación de las cascadas neuroendócrinas necesarias para la preñez (Coopersmith & Erskine, 1994). Las cuales, también pueden disminuir los comportamientos de proceptividad, una vez que la prolactina y la progesterona se han incrementado. El mecanismo de saciedad también podría estar explicando las diferencias de solicitudes observadas entre los grupos de estimulación. En el sistema motivacional la recompensa puede ser considerada como una función dinámica, en la cual un estímulo que produce una baja recompensa, no incrementa la frecuencia de la conducta; al contrario, una recompensa moderada sí lo hace. Sin embargo, una alta recompensa induce una respuesta inhibitoria que lleva a la saciedad. Esto podría estar explicándonos por qué el condicionamiento no se ha podido realizar. Ya que, el valor recompensante también depende del tiempo de exposición. La saciedad sexual decreta la respuesta por un corto periodo, y la recompensa asociada a una pareja sexual es necesaria para el condicionamiento de las preferencias sexuales en un largo periodo (Pfaus, y cols 2003).

Condicionamiento

Por otro lado para que se realice satisfactoriamente el condicionamiento es necesario que se cumpla con ciertos criterios. Como contigüidad, contingencia y el uso de un estímulo que provoque una respuesta fisiológica incondicionada (RI). También el estímulo neutro (EN) debe siempre preceder al estímulo incondicionado (EI), para que el EN- prediga al EI. Y así se convierta en un estímulo condicionado (EC). A su vez, este estímulo provocará una respuesta similar a la provocada por el EI. La cual, es una respuesta condicionada (RC) (Pavlov, 1927). En el presente trabajo se cumplieron con los criterios antes mencionados, sin embargo la asociación entre el EI (estimulación del clítoris) y el EC (olor a almendra), parece

no haberse formado. En base a los resultados de éste trabajo, la estimulación del clítoris funciona solamente como un estímulo incondicionado. El cual, facilita las conductas apetitivas como las solicitaciones y las vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz. Sin embargo al trasladarse éstos estímulos a un macho experto sexual, no se encuentra una diferencia significativa entre el macho asociado a estimulación del clítoris y el macho asociado a no estimulación.

Se sabe que la estimulación masiva del clítoris, induce más inmunoreactividad a c-fos que la estimulación pausada en la amígdala medial posteroventral aplicada con un pincel (Parada y cols. 2010), y posterodorsal aplicada con vibrador (Cibrián-Llanderal. 2011). Esto concuerda con lo observado durante el orgasmo inducido por auto estimulación vaginocervical en mujeres con daño espinal, en las cuales también se observó la activación de la amígdala medial con técnicas de resonancia magnética funcional (Komisaruk, Beverly Whipple, Crawforda, Grimesa, Wen-Ching, Kalnin, Mosierc. 2004). También, la auto estimulación del clítoris activa diferentes regiones corticales en mujeres, todas coincidiendo en el lóbulo medial paracentral (Komisaruk, Wise, Frangos, Liu, Allen, Brody. 2011). En otro trabajo, utilizando estimulación eléctrica en el nervio pudendo, se encontró que la estimulación del clítoris en mujeres, activa el giro dentado, la ínsula y el putamen (Michels, Mehnert, Boy, Schurch, Kollias. 2010). Dado que, en la rata la estimulación del clítoris, activa entre otras áreas la amígdala medial (Parada y cols. 2010; Cibrián-Llanderal. 2011), resulta pertinente hacer énfasis que la amígdala es una de las estructuras más importantes para el procesamiento del aprendizaje asociativo. Participa en la asignación del significado emocional de un estímulo y también se ha considerado que los diferentes áreas de la amígdala en particular la basolateral (BLA) y la medial (MeA) pueden estar relacionados con diferentes subsistemas, que están involucrados en distintos aspectos del proceso de aprendizaje.

La amígdala basolateral, está relacionada con el valor afectivo que se le da a un estímulo incondicionado durante el condicionamiento, y se sugiere que es responsable de la asociación entre el EI-EC (Everitt y cols. 2003, Gabriel y cols. 2003). En contraste con la MeA, que está relacionada con la asociación E-R de un estímulo recompensante; y en la promoción de la acción de respuestas condicionadas con estímulos aversivos. Se ha reportado que lesiones en la BLA pueden provocar una falla en la asociación del EC y el valor del EI y una devaluación de la RC (Hatfield y cols. 1996, Setlow y cols. 2002). En contraste lesiones en la MeA impiden la asociación entre el EC y la respuesta preparatoria evocada por el EI (Hatfield y cols. 1996). También se ha reportado que lesiones en la MeA pero no en la BLA impiden la realización de la respuesta condicionada. Sugiriendo que la MeA está relacionado con la asociación entre el EI y la respuesta consumatoria asociada. Finalmente lesiones en la BLA más no en la MeA impiden la transferencia instrumental afectando la asociación entre el EC y la RI. Ésta asociación requiere de la integridad del núcleo accumbens core y de su innervación dopaminérgica. Por ejemplo el perfecto funcionamiento del MeA es necesario para el incremento extracelular de los niveles de dopamina en respuesta a la comida (Ahn y Philipps, 2003). Everitt y cols (2003) propusieron un modelo para el papel de la amígdala en el condicionamiento. Éste modelo propone que la BLA está implicada en la asociación entre el EC y el valor afectivo del EI y que ésta información es usada por la MeA para producir una respuesta conductual. Lo anterior podría estar explicando por qué la estimulación del clítoris no induce una preferencia condicionada, lo que pudo haber sucedido, es que hubo una falla en la asociación del EC (olor) y el valor del estímulo incondicionado (estimulación del clítoris), al no categorizarse como un estímulo importante, la asociación no se realizó.

Vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz.

Otra medida de motivación que indica que la estimulación del clítoris puede inducir motivación sexual fueron las vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz las cuales solo fueron emitidas por las hembras durante la estimulación del clítoris. Las hembras del grupo CLS pausada realizaron vocalizaciones desde la primer sesión, al contrario de las hembras del grupo CLS masiva, en las cuales se registró un incremento en el número de vocalizaciones en la sesión 10. Por el contrario las hembras del grupo control no realizaron vocalizaciones en la última sesión del condicionamiento. Esto pudiera indicar que los distintos patrones de estimulación del clítoris sí son recompensantes ya que durante la ejecución de los mismos se pueden registrar vocalizaciones de 50 kHz las cuales están asociadas a estados afectivos positivos (Knutson y cols. 2002) y éstas no se presentan en ausencia de la estimulación del clítoris, ya que no se registraron ni antes ni después de la estimulación. Se ha reportado que las ratas emiten vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz durante la predicción de la recompensa (Burgdorf y cols. 2000) lo cual difiere con lo reportado en el presente trabajo, ya que ni las hembras del grupo de estimulación masiva ni pausada realizaron vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz antes de la estimulación del clítoris. También se ha reportado que los estímulos condicionados inducen la emisión de vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz (Knutson y cols. 1999) en el presente trabajo se registro la emisión de vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz ante el olor condicionado, sin embargo no se tuvo registro de ninguna. Lo cual podría estar indicando que la asociación entre el estímulo incondicionado (Estimulación del clítoris) y el estímulo condicionado (olor a almendra) no se realizó, dada la ausencia de vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz en presencia del olor condicionado.

Preferencia de pareja condicionada

Tenemos diferentes evidencias del efecto de la estimulación del clítoris en comportamientos apetitivos, los cuales pueden ser interpretados como motivacionales. Sin embargo, no parecen ser de suficiente intensidad para que se lleve a cabo el condicionamiento. A su vez, Parada y colaboradores (2011) reportaron que la estimulación del clítoris aplicada con un pincel induce preferencia de pareja condicionada en ratas Long-Evans, solo cuando las hembras fueron condicionadas con un olor colocado en una gasa, más no cuando el olor estaba presente en un macho al cual la hembra no tenía acceso. Esto causó el efecto contrario en las hembras, ya que prefirieron al macho asociado a no estimulación. Éste efecto ha sido observado en machos a los cuales durante el condicionamiento solo se les permitió realizar 5 intromisiones, más no eyaculación en presencia de una hembra con olor. Dichos machos muestran preferencia a la hembra sin olor (Kippin and Pfaus, 2001).

La estimulación del clítoris que se da con un vibrador bien pudiera imitar (al menos en parte) la estimulación natural que el macho da a la hembra durante la fase precopulatoria (i.e. olfateos genitales, y topeteos), y durante la fase copulatoria per se con las montas, intromisiones y eyaculaciones. De cualquier forma la estimulación artificial podría inducir un estado de motivación en la hembra y prepararla para copular. Sin embargo, si ésta no llegara a consumir la conducta sexual, podría interpretarse como un estímulo no recompensante o aversivo. Por ejemplo, Parada y colaboradores (2011) realizaron un experimento sustituyendo durante el condicionamiento al macho con una gasa impregnada de olor. Los autores encontraron que la estimulación del clítoris aplicada con un pincel, sí inducía una preferencia

de pareja condicionada hacia machos con olor condicionado. Sin embargo, el condicionamiento no ocurría si durante la estimulación del clítoris estaba presente el macho.

Hay grandes diferencias en la estimulación dada con un pincel y aquella con un vibrador. Se han reportado diferentes efectos en el comportamiento de la rata dependiendo del tipo de estimulación que se ha dado. Mientras Parada (2010) reporta que la estimulación pausada dada con un pincel induce preferencia de lugar condicionado, Tecamachaltzi (2010) reporta que la estimulación del clítoris aplicada con un vibrador comercial no induce preferencia de lugar condicionado, sin embargo sí tiene un efecto en los comportamientos proceptivos (Tecamachaltzi, 2010; Cibrián-Llenderal y cols. 2010). Esto pudiera indicar que la estimulación del clítoris dada con un vibrador comercial no induce un estado de recompensa de suficiente intensidad como para condicionar una preferencia, ya sea de lugar o de pareja, aunque sí sea suficiente para facilitar los comportamientos proceptivos, como las sollicitaciones y los que indican que las hembras se encuentran en un estado afectivo positivo, como las vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz.

Otra posibilidad pudiera ser que la estimulación del clítoris aplicada con un vibrador induce un estado de recompensa muy sutil, que al competir con la cópula no es capaz de inducir una preferencia de pareja. Lo cual se asemeja a lo reportado con la estimulación vaginocervical aplicada con un tubo de vidrio, en la que se ha comprobado que induce preferencia de lugar condicionado (Meerts and Clark, 2009). Sin embargo no se ha reportado que induzca preferencia de pareja condicionada.

Estrés

Es posible que los hallazgos observados no se deben a la recompensa sexual, si no a un bajo nivel de estrés. Se sabe que un estímulo estresor como la supresión de la comida causa una supresión de la conducta sexual en las ratas hembra (Andrew, Pierce, Izu Iwueke, y Michael H. Ferkin, 2007). Sin embargo también se sabe que el estrés a un bajo nivel tiene un efecto inespecífico que dependiendo del estímulo presente o del ambiente en el que se presenta puede facilitar diferentes tipos de conducta. Por ejemplo se sabe que un pequeño pinchazo en la cola de un macho cuando está frente a otro macho puede desencadenar una conducta agresiva (Caggiula, 1972). En contraste también se ha encontrado que el pinchazo en la cola de ratas macho en presencia de comida induce a éstas a comer (Antelman, Szechtman, Antelman, Szechtman, 1975), y que éste mismo estímulo aplicado a hembras vírgenes en presencia de crías, puede desencadenar la conducta materna (Szechtman, Siegel, Rosenblatt, J. S.; Komisaruk, B. R., 1977). Esto podría estar explicando la activación de la conducta sexual en las hembras de estimulación masiva. Ya que, ésta pudiera estar induciendo un estado de estrés, lo suficientemente bajo como para facilitar la conducta sexual de las hembras, pero no tan fuerte como para inducir una preferencia condicionada. Por lo tanto la estimulación masiva pudiera ser un poco estresante y producir una activación general en la rata, lo cual pudiera expresarse como solicitudes en el contexto sexual.

CONCLUSIONES

En conclusión la estimulación del clítoris aplicada con un vibrador comercial, no induce la formación de preferencia de pareja condicionada, sin embargo sí facilita las conductas proceptivas como las solicitudes y las vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz. Esto nos indica que la estimulación del clítoris aplicada con un vibrador funciona como un estímulo incondicionado que modula la proceptividad y la fertilidad, pero no induce un estado que facilite la asociación con el estímulo condicionado. Por lo tanto entender los efectos de los diferentes ritmos e intensidad de la estimulación del clítoris nos puede ayudar a elucidar los mecanismos por los cuales se interpreta la recompensa sexual y sus consecuencias en la conducta sexual.

PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto de la estimulación masiva en hembras ovariectomizadas y tratadas solo con estradiol.
- Replicar el experimento en mujeres y evaluar el efecto de la estimulación masiva en el tratamiento del desorden de deseo sexual.
- Analizar la activación de áreas cerebrales utilizando c-fos en hembras que mostraron una preferencia hacia el macho con olor condicionado, en comparación con hembras que no la mostraron; Así como realizar un estudio comparativo del cerebro de hembras que recibieron estimulación masiva en comparación con las hembras de estimulación pausada y control.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahn S, Philipps AG. (2003). Independent modulation of basal and food-evoked dopamine efflux in the nucleus accumbens and medial prefrontal cortex by the central and basolateral amygdalar nuclei in the rat. *Neuroscience* 116:295–305.
- Aller, J. Enciclopedia temática de FERTILAB. (2008)
- Antelman, S. M.; Szechtman, H. (1975). Tail pinch induces eating in sated rats which appears to depend on nigrostriatal dopamine. *Science* 189:731–733.
- Andrew A. Pierce1, Izu Iwueke, and Michael H. Ferkin,(2007). Food deprivation and the role of estradiol in mediating sexual behaviors in meadow voles. *Physiol Behav.* 2007 February 28; 90(2-3): 353–361.
- Barfield, R. J., Auerbasch, P., Gueyer, L. A., & McIntoch, T. K. (1979). Ultrasonic vocalizations in rat sexual behavior. *American Zoologist*, 19, 469-480.
- Belaso, G., Estañol, B., & Juárez, H. (2008). Los sistemas de recompensa en el cerebro. *Rev.Neurol.*, Numero especial, 22-24.
- Beyer C, Contreras G, Morali G, Larsson K. Effects of castration and sex steroid treatment on the motor copulatory pattern in the rat. (1981)*Physiol Behav*; 27:727–730.
- Brudzynski, S. M., Bihari, F., Ociepa, D., & Fu, X. (1993). Analysis of 22 kHz ultrasonic vocalization in laboratory rats: Long and short calls. *Physiol Behav.*, 54, 215-221.
- Burgdorf, J., Knutson, B., & Panksepp, J. (2000). Anticipation of Rewarding Electrical Brain Stimulation Evokes Ultrasonic Vocalization in Rats. *Behavioral Neuroscience*, 140, 320-327.
- Cabilio, E. (1998). Behavioral Observation Program.

- Caggiula, A. R. Shock-elicited copulation and aggression in rats. (1972). *J. Comp. Physiol. Psychol.* 80:393–397;
- Cibrián-Llenderal, T., Tecamachaltzi-Silvarán, M. B., Triana-Del Rio, R., Pfaus, J. G., Manzo, J., & Coria-Ávila, G. A. (2010). Clitoral stimulation facilitates appetitive sexual behavior and reproduction in rats. *PhysiolBehav.*
- Cibrián-Llenderal, T. (2011) Tesis de maestría, Insituto de Neuroetología de la Universidad Veracruzana.
- Coria-Avila, G. A., Ouimet, A. J., Pacheco, P., Manzo, J., & Pfaus, J. G. (2005). Olfactory conditioned partner preference in the female rat. *Behav.Neurosci.*, 119, 716-725.
- Coria-Avila, G.A., Jones, S.L., Solomon, C.E., Gavrila, A.M., Jordan, G.J., Pfaus, J.G., 2006. Conditioned partner preference in female rats for strain of male. *Physiol. Behav.* 88, 529–537.
- Coria-Avila, G. A. & Pfaus, J. G. (2007). Neuronal activation by stimuli that predict sexual reward in female rats. *Neuroscience*, 148, 623-632.
- Coria-Avila, G.A., Solomon, C.E., Vargas, E.B., Lemme, I., Ryan, R., Ménard, S, 2008
Neurochemical basis of conditioned partner preference in the female rat: I. Disruption by naloxone. *Behav. Neurosci.* 122, 385–395.
- Coria-Avila, G. A., Pfaus, J. G., Miquel, M., Pacheco, P., & Manzo, J. (2008). Conditioned preferences induced by sex and drugs: a comparison of the neural bases. *Rev.Neurol.*, 46, 213-218.
- Coria-Avila, G. A., Paredes-Ramos, P., Espinoza-Palencia, M., Soto-Sid, A. H., Romero-Ortiz, L., & Carrasco, A. (2009). Clitoral stimulation in the sow: physiological, endocrine

- and reproductive effects. Annual Meeting of the Society for Behavioral Neuroendocrinology .
- Cruz, Y., Zempoalteca, R., Lucio, R. A., Pacheco, P., Hutson, R., & Martinez-Gómez, M. (2004). Pattern of sensory innervation of the perineal skin in the female rat. *Brain Research*, 1024, 97-103.
- Coopersmith, C. & Erskine, M. S. (1994). Influence de paced mating and number of intromissions on fertility in the laboratory rat. *Journal of Reproduction and Fertility*, 102: 451-458.
- Devries, A. C., Guptaa, T., Cardillo, S., Cho, M., & Carter, C. S. (2002). Corticotropin-releasing factor induces social preferences in male prairie voles. *Psychoneuroendocrinology*, 27, 705-714.
- Erskine, M. S. (1989). Solicitation behavior in the estrous female rat: a review. *Hormones and Behavior*. 23, 473-502.
- Everitt BJ, Cardinal RN, Parkinson JA, Robbins TW. (2003). Appetitive behavior: impact of amygdala-dependent mechanisms of emotional learning. *Ann N Y Acad Sci*. 985:233–250.
- Graham, M. D and Pfaus, J.P. (2010). Differential regulation of female sexual behaviour by dopamine agonists in the medial preoptic area. *Pharmacol Biochem Behav*.
- Hatfield T, Han J-S, Conley M, Gallagher M, Holland P. (1996). Neurotoxic lesions of basolateral, but not central, amygdala interfere with pavlovian second-order conditioning and reinforcer devaluation. *J neurosci*.16:5256–5265.

- Joseph J., Normandin, & Murphy, A. Z. (2008). Nucleus Paragigantocellularis Afferents in Male and Female Rats: Organization, Gonadal Steroid Sensitivity, and Activation During Sexual Behavior. *J Comp Neurol.* 508, 771-794.
- Kippin, T.E., Pfaus, J.G., 2001. The development of olfactory conditioned ejaculatory preferences in the male rat. I. Nature of the unconditioned stimulus. *Physiol. Behav.* 73, 457–469.
- Knutson, B., Burgdorf, J., & Panksepp, J. (1999). High-frequency ultrasonic vocalizations index conditioned pharmacological reward in rats. *Physiology and Behavior.* 66, 639-643.
- Knutson, B., Burgdorf, J., & Panksepp, J. (2002). Ultrasonic Vocalizations as Indices of Affective States in Rats. *Psychological Bulletin*, 128, 961-977.
- Komisaruk BR, Wise N, Frangos E, Liu WC, Allen K, Brody S. (2011). Women's Clitoris, Vagina, and Cervix Mapped on the Sensory Cortex: fMRI Evidence. *J Sex Med.* (10):2822-30.
- Komisaruk B. R, Beverly Whipple B., Crawford B., Grimesa, S. Wen-Ching Liuc, Kalninc, A. Mosierc K. (2004) Brain activation during vaginocervical self-stimulation and orgasm in women with complete spinal cord injury: fMRI evidence of mediation by the Vagus nerves. *Brain Research* 1024: 77– 88.
- Lee.J.W. & Erskine, M. S. (2000). Changes in pain threshold and lumbar spinal cord immediate-early gene expression induced by paced and nonpaced mating in female rats. *Brain Research*, 861, 26-36.
- Martínez-Gómez, M. Actividad reproductiva de la rata hembra: Análisis anatómico, electrofisiológico y conductual del área pélvica. Tesis doctoral, Colegio de Ciencias

- y Humanidades, Unidad académica de los ciclos profesional y de posgrado, Centro de Neurobiología. Universidad Autónoma de México. 1996
- Marson, L. & Foley, K. A. (2004). Identification of neural pathways involved in genital reflexes in the female: a combined anterograde and retrograde tracing study. *Neuroscience*, 127, 723-736.
- Marson, L. & Murphy, A. Z. (2006). Identification of neural circuits involved in female genital responses in the rat: A dual virus and anterograde tracing study. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 291, R419-R428.
- McClintock, M. K. & Aller, N. T. (1978). The role of the female during copulation in wild and domestic Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Behaviour*, 67: 67-96.
- Michels L, Mehnert U, Boy S, Schurch B, Kollias S. (2010). The somatosensory representation of the human clitoris: an fMRI study. *Neuroimage*.1; 49(1):177-84.
- McIntoch, T. K., Barfield, R. J., & Thomas, D. (1984). Electrophysiological and ultrasonic correlates of reproductive behavior in the male rat. *Behavioral Neuroscience*, 98, 1100-1103.
- Medina F, Siddiqui A, Scimonelli T, Fensek C, Wilson CA, Celis ME. The inter-relationship between gonadal steroids and POMC peptides, beta-endorphin and alpha-MSH, in the control of sexual behavior in the female rat. *Peptides* 1998; 19:1309–16.
- Meerts, S. H. and Clark A. S. (2009) Artificial Vagino-cervical Stimulation Induces a Conditioned Place Preference in Female Rats. *Horm Behav.* 2009 January ; 55(1): 128–132.

- Miczek, K. A., Tornatzky, W., & Vivian, J. (1991). Ethology and neuropharmacology: Rodent ultrasounds. In B. Olivier, J. Mos, & J. L. Slangen (Eds.). *Animal models in psychopharmacology*, 409-427.
- Parada M, Chamas L, Censi S, Coria-Avila G, Pfaus JG. (2009) Clitoral Stimulation Induces Conditioned Place Preference and Fos Activation in the Rat. *Horm & Behav*;57:112-118.
- Parada M., Abdul-Ahad, Censi, S., Sparks, L., Pfaus JG. (2011). Context alters the ability of clitoral stimulation to induce a sexually-conditioned partner preference in the rat. *Hormones and Behavior* 59 520–527
- Paredes, R. & Alonso, A. (1997). Sexual behavior regulated (paced) by the female induces conditioned place preference. *Behav. Neurosci.*, 111, 123-128.
- Paredes, R. & Martinez, I. (2001). Naloxone Blocks Place preference Conditioned After Pace Mating in Female Rat. *Behav. Neurosci.*, 115. No 6, 1363-1367.
- Pavlov, I. P. (1927). *Conditioned Reflexes and Psychiatry*. Horley Gantt, M. D. [2]. New York, International Publishers.
- Pfaus, J. G., Kippin, T. E., & Centeno, S. (2001). Conditioned and Sexual Behavior: A Review. *Hormones and Behavior*, 40:291-321.
- Pfaus, J. G., Annette Shadiack, Tanya Van Soest, Maric Tse, and Perry Molinoff. (2004). Selective facilitation of sexual solicitation in the female rat by a melanocortin receptor agonist. *PNAS*, 101: 27.
- Setlow B, Gallagher M, Holland P. (2002). The basolateral complex of the amygdala is necessary for acquisition but not expression of CS motivational value in appetitive Pavlovian second-order conditioning. *Eur J Neurosci*. 15:1841–1853.

- Szechtman, H.; Siegel, H. I.; Rosenblatt, J. S.; Komisaruk, B. R. (1977). Tail pinch facilitates onset of maternal behavior in rats. *Physiol. Behav.* 19:807–809.
- Tecamachaltzi-Silvarán, M.B. (2010). Efecto de la estimulación del clítoris en el comportamiento sexual y preferencia de lugar condicionada en la rata Wistar. Tesis de licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana.
- DeVries AC, DeVries MB, Taymans SE, Carter CS. The effects of stress on social preferences are sexually dimorphic in prairie voles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 11980-4.
- Wade, L. D., Kremer, E. C., & Brown, J. (2008). The incidental orgasm: the presence of clitoral knowledge and the absence of orgasm for women.
- Wiedey, J., Sipsky Alexander, M., & Marson, L. (2008). Spinal Neurons Activated in Response to Pudendal or Pelvic Nerve Stimulation in Female Rats. *Brain Research*, 1197, 106-114.
- Williams, J. R., Catania, K. C., & Carter, C. S. (1992). Development of partner preferences in female prairie voles (*Microtus Ochrogaster*): the role of social and sexual experience. *Hormones and Behavior*, 40, 133-138.
- Wilson CA, Thody AJ, Hole DR, Grierson JP, Celis ME. Interaction of estradiol, alpha-melanocyte stimulating hormone, and dopamine in the regulation of sexual receptivity in the female rat. *gNeuroendocrinology* 1991;54:14–22.
- Yamazaki, K., Beauchamp, G. K., Kupniewski, D., Bard, J., Thomas, L., & Boyse, E. A. (1998). Familial imprinting determines H-2 selective mating preferences. *Neuroscience*, 240, 1331-1332.

- Young, L. J. & Wang, Z. (2004). The neurobiology of pair bonding. *Nat.Neurosci.*, 7, 1048-1054.
- Julich, S. (2005). Stockholm syndrome and child sexual abuse. *J Child Sex Abus*, 14(3), 107-129.
- Namnyak, M., Tufton, N., Szekely, R., Toal, M., Worboys, S., & Sampson, E. L. (2008). 'Stockholm syndrome': psychiatric diagnosis or urban myth? *Acta Psychiatr Scand*, 117(1), 4-11.
- Tzschentke, T. M. (1998). Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog Neurobiol*, 56(6), 613-672.