

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

Validación de una Arena de Selección Múltiple de Pareja como Modelo Experimental para el Estudio de la Eyaculación Precoz

T E S I S

Que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas y de la Salud

P R E S E N T A

Biól. Exp. Jesús Olayo Lortia

Comité Tutorial:

Cotutora: Dra. Adriana Morales Otal

Cotutor: Dr. Javier Velázquez Moctezuma

Asesor: Dr. Armando Ferreira Nuño

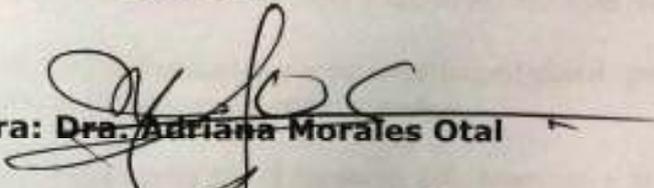
El Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93.

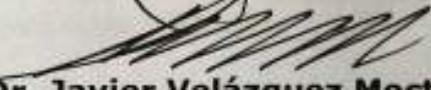
El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

Biól. Exp. Jesús Olayo Lortia

El día 30 de enero del 2015

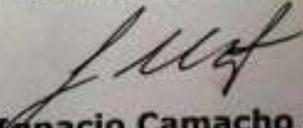
Jurado:


Cotutora: Dra. Adriana Morales Otaí


Cotutor: Dr. Javier Velázquez Moctezuma


Asesor: Dr. Armando Ferreira Nuño


Sinodal: Dra. Wendy Portillo Martínez


Sinodal: Dr. Ignacio Camacho Arroyo

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar tengo que agradecer a Dios, por haberme permitido vivir esta misión llamada **VIDA** en las condiciones que el dispuso para mí y por darme las herramientas para poder vivirla plenamente.

Para mi **Papá**: Jesús Olayo González por su ejemplo de honradez y trabajo, por sus enseñanzas y los valores que me ha inculcado, por el amor y apoyo durante toda mi vida.

Para mi **Mamá**: Josefina Lortia Hernández por su amor incondicional, por todo el trabajo duro que ha realizado para que yo logre mis metas y sueños.

Para mi **hermano** David Olayo Lortia por el apoyo en todo momento a lo largo de mi vida, apoyándome en todo para lograr mis metas.

Para toda mi **familia Olayo** y **familia Lortia** por el apoyo que me han brindado durante **TODA MI VIDA**.

Para mi **novia** Adriana Solórzano Morales por todos los momentos de convivencia, por sus porras, por su apoyo, por su paciencia y sobre todo por el amor que me ha brindado durante estos años en los que ha estado conmigo.

A todos aquellos que han contribuido para que yo lograra esta meta, en particular a mis grandes amigos y hermanos de vida: **Ismael, Paul, Raúl, Chino, Jesús Reyes, Juan de Dios, María de Jesús y Claudia**. Gracias por su amistad y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la **Dra. Adriana Morales Otal** y al **Dr. Armando Ferreira Nuño** por todo el apoyo que me han brindado todos estos años, por sus enseñanzas, consejos, regaños (casi siempre merecidos), palabras de aliento, por su amistad y sobre todo por creer siempre en mí, por todo eso y mucho más les estaré agradecido toda mi vida.

Al **Dr. Javier Velázquez Moctezuma** por los consejos, amistad y enseñanzas que me ha transmitido a lo largo de mi formación.

A la **Dra. Wendy Portillo** y al **Dr. Ignacio Camacho** por sus observaciones, comentarios y sugerencias indispensables para mejorar el escrito y presentación de esta tesis de doctorado.

Al **Biól. Antonio Cruz Benites** por ser mi mano derecha y ambas piernas durante todo el desarrollo de este trabajo y por su amistad.

A la **Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa**, especialmente a los profesores de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud que han contribuido en mi educación y formación como Biólogo Experimental y Doctor en Ciencias Biológicas y de la Salud.

A la **Coordinación del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud**, muy especialmente a la Dra. María Jesús Ferrara, Dra. Reyna Fierro, y a la Srta. Patricia Cruz; así como a todos los miembros de la Comisión del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, que me apoyaron y brindaron su asistencia.

Al **Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología** por la beca otorgada 2013- 2014 y al **Instituto Mexicano del Petróleo** por el apoyo otorgado durante 2013 – 2014.

¡ MUCHAS GRACIAS A TODOS !

**“LA VIDA ES UNA COSA MARAVILLOSA Y
HAY TANTAS COSAS POR HACER” STEPHEN HAWKING.**

Índice de Abreviaturas

EP = Eyacuación precoz

ASMP = Arena de Selección Múltiple de Pareja

AT = Arena típica

CSM = Conducta sexual masculina

NM = Número de montas

NI = Número de intromisiones

LM = Latencia de monta

LI = Latencia de intromisión

LE = Latencia de eyacuación

PRPE = Periodo refractario post-eyacuatorio

FE = Frecuencia eyacuatoria

HR = Hit rate o tasa de aciertos

III = Intervalo inter-intromisión

IIC = Intervalo inter-copulatorio

APM = Área preóptica media

NCST = Núcleo de la cama de la estría terminal

AM = Amígdala media

SPFp = Núcleo talámico parvocelular subparafascicular

ETLs = Neuronas espinotalámicas lumbares

CCK = Colecistoquinina

SNC = Sistema nervioso central

AMPc = Adenil monofosfato cíclico

SGP = Sustancia gris periacueductal

NPV = Núcleo paraventricular del hipotálamo

SNe = Sustancia nigra compacta

AVT = Área ventral tegmental del hipotálamo

NPG = Núcleo paragigantocelular

ISRS = Inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina

DSMIV = Manual estadístico de trastornos mentales 4ta. Edición

INEGI = Instituto nacional de estadística y geografía

CL = cociente de lordosis

WAY-100635=N-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]etil]-N-

(2piridinil)cyclohexanocarboxamida 3HCL

ANOVA = Análisis de varianza

ÍNDICE

	PÁGINA
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	5
4. DESCRIPCIÓN DE LA CONDUCTA SEXUAL MASCULINA DE LA RATA MACHO ADULTA	6
4.1. <i>Patrones copulatorios de la rata macho adulta.</i>	6
4.2. <i>Evaluación de la conducta sexual de la rata en una Arena Típica.</i>	8
4.3. <i>Parámetros de la conducta sexual masculina de la rata macho adulta que se utilizan para evaluar el componente motivacional y el ejecutorio.</i>	10
5. EYACULACIÓN	14
5.1. <i>Definición y componentes.</i>	14
5.1.1. <i>Fase de emisión</i>	14
5.1.2. <i>Fase de expulsión</i>	15
5.1.3. <i>Control neural de la eyaculación</i>	17
5.1.4. <i>Sistemas de neurotransmisión involucrados en control de la eyaculación (Dopamina y Serotonina)</i>	21

5.2. Eyaculación Precoz.	37
5.2.1. Definición y Etiología	37
5.2.2. Teoría serotoninérgica en la etiología de la eyaculación precoz	39
6. MODELOS ANIMALES	40
6.1. Función y empleo de modelos animales.	40
6.2. Criterios de validación de los modelos animales.	42
6.3. Modelo actual para evaluar la eyaculación precoz en la rata.	43
6.4. La Arena de Selección Múltiple de Pareja (ASMP).	44
7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	46
8. HIPÓTESIS	47
9. OBJETIVO GENERAL	47
9.1. Objetivos particulares.	47
10. METODOLOGÍA GENERAL	48
10.1. Animales: obtención y mantenimiento.	48
10.2. Preparación de los animales experimentales y estímulo.	48
11. PRIMER EXPERIMENTO: VALIDEZ DE APARIENCIA: Comparación de la conducta sexual masculina de dos grupos de ratas machos en una arena típica y en la arena de selección múltiple de pareja	50

<i>11.1. Metodología del Primer Experimento.</i>	50
12. SEGUNDO EXPERIMENTO: VALIDEZ TEORICA: Evaluación del efecto que tiene administración de un antagonista de los receptores serotoninérgicos 5HT_{1A}, sobre la conducta sexual masculina de la rata macho adulta, probadas en una arena típica y en la arena de selección múltiple de pareja	52
<i>12.1. Metodología del Segundo Experimento.</i>	52
13. TERCER EXPERIMENTO: VALIDEZ PREDICTIVA: Evaluación del efecto que tiene la administración de un inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina, sobre la conducta sexual masculina de la rata macho adulta en la arena de selección múltiple de pareja	54
<i>13.1. Metodología del Tercer Experimento.</i>	54
14. ESTADÍSTICA	55
<i>14.1. Análisis estadístico Experimento 1: Validez de Apariencia.</i>	55
<i>14.2. Análisis estadístico del Experimento 2: Validez Teórica.</i>	55
<i>14.3. Análisis estadístico del Experimento 3: Validez Predictiva.</i>	55
15. RESULTADOS	56
<i>15.1. Experimento 1: Validez de Apariencia.</i>	56

<i>15.2. Experimento 2: Validez Teórica.</i>	58
<i>15.3. Experimento 3. Validez Predictiva.</i>	63
16. DISCUSIÓN	66
<i>16.1. Experimento 1: Validez de Apariencia.</i>	66
<i>16.2. Experimento 2: Validez Teórica.</i>	69
<i>16.3. Experimento 3: Validez Predictiva.</i>	73
17. CONCLUSIÓN	76
18. PROPUESTAS A FUTURO	78
19. REFERENCIAS	79
20. ANEXO: ARTÍCULO PUBLICADO	86

“Further definition on the multiple partner choice arena: a potential animal model for the study of premature ejaculation.”

1. RESUMEN

La eyaculación precoz (**EP**) es una de las disfunciones sexuales más comunes en la población mexicana y a nivel mundial. La **EP** se presenta como un patrón persistente que se caracteriza por que la eyaculación se presenta antes o inmediatamente después de la penetración del pene en la vagina y mucho antes de que el sujeto lo desee, provocando angustia, malestar, depresión, síntomas que se exacerbaban como resultado de que el sujeto no pueda controlar el reflejo eyaculatorio. Con el objetivo de tener un mejor modelo animal para poder evaluar la eyaculación precoz, en esta tesis se comprobó la potencia de una Arena de Selección Múltiple de Pareja (**ASMP**) innovada en nuestro laboratorio por Ferreira Nuño y cols. en el 2005, como modelo animal para la evaluar la eyaculación precoz. Para este estudio se realizaron diferentes experimentos con el fin de comprobar si la **ASMP** cumplía con los criterios de validación establecidos por Willner en 1984, los cuales se utilizan para validar diversos modelos animales. En el primer experimento, se comprobó la **Validez de Apariencia**, evaluando si las ratas macho mostraban en la **ASMP** características semejantes a las de la **EP** que presenta el humano. Para ello, evaluamos la conducta sexual masculina de dos grupos de ratas macho, los cuales fueron sometidos consecutivamente en dos tipos de arena: la típica (**AT**), formada por un redondel de acrílico y la **ASMP**, constituida por 4 redondeles de acrílico colocados en círculo, en los que se colocaron cuatro machos expertos y en el centro una hembra receptiva, que pudo elegir al macho con el que deseó copular. Los resultados de este experimento demostraron que los machos que fueron evaluados en la **ASMP**, se comportaron como **eyaculadores rápidos**, al disminuir los parámetros de conducta sexual masculina. El segundo experimento consistió en administrarles, a dos grupos de machos respectivamente (n=14), solución salina o

el antagonista de los receptores serotoninérgicos 5HT_{1A}, el **WAY-100635** (0.1 mg/kg), durante 15 días consecutivos. Cada grupo fue dividido al azar en dos, 7 machos de cada tratamiento fueron evaluados en la **AT** y los otros 7 machos de cada tratamiento fueron evaluados en la **ASMP**, con el fin de determinar si la eyaculación rápida que presentan los machos en la **ASMP** se debe a la participación de estos receptores y así, comprobar, el criterio de **Validez Teórica**. Los resultados de este experimento demostraron que con el tratamiento de **WAY-100635**, las ratas macho progresivamente aumentaron su latencia de eyaculación en la **ASMP**, alcanzando valores similares a los presentados por los machos tratados con solución salina en la **AT**, por lo tanto esto demostró que nuestra arena cumple con el criterio de Validez Teórica. Por último, el tercer experimento consistió en administrar a dos grupos de ratas macho, solución salina, a uno, y al otro, un inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina, la **Dapoxetina** (30 mg / kg), con el fin de determinar si la eyaculación rápida que presentan los machos en la **ASMP**, se retarda con la administración de este fármaco, que actualmente es el más utilizado en la clínica para el tratamiento de la **EP** y de esta manera validar en nuestro modelo el criterio de Validez **Predictiva** propuesto por Willner. En este experimento encontramos que efectivamente, con la administración de la Dapoxetina los machos dejaron de comportarse como eyaculadores rápidos, en la **ASMP**, por lo tanto nuestra arena cumple con el criterio de Validez Predictiva.

Por lo tanto en el presente trabajo de investigación de doctorado comprobamos que la **ASMP**, podría ser un modelo experimental más completo para la evaluación de la eyaculación rápida en la rata debido a que cumple con los tres criterios propuestos por Willner: **Validez de Apariencia, Teórica y Predictiva**.

2. ABSTRACT

Premature ejaculation (**PE**) is one of the most common sexual dysfunctions in the population at national and global levels. The PE is presented as a persistent pattern characterized by ejaculation occurs before or immediately after penetration of the penis into the vagina and long before the subject wanted, leading to distress, discomfort and even depression, because the subject can not control the ejaculatory reflex. In order to have a better model to evaluate rapid ejaculation in male rats, in this thesis the power of a Multiple Partner Choice Arena (**MPCA**) developed in our laboratory by Ferreira Nuño et al. in 2005, as an animal model for evaluating rapid ejaculation in rat it was verified. For this study different experiments to test whether **MPCA** met the validation criteria established by Willner 1984, which are used to validate various animal models, were performed. In the first experiment, it was verified the **Face validity** assess whether male rats showed in **MPCA** similar to that characteristics of **EP** occurring in the human. To do this we evaluate male sexual behavior of two groups of male rats which were subjected successively to two types of arenas, the standard (**SA**) formed by a circle of acrylic and **MPCA**, consisting of 4 roundels acrylic placed in circle, in which four experts and center males a receptive female, who could choose the male with whom he wished to copulate placed. The results of this experiment demonstrated that males were subjected to the **MPCA**, showed rapid ejaculation, by reducing male sexual behavior parameters. The second experiment consisted in administering, to respectively two groups of males (n = 14) saline or the antagonist 5HT_{1A} serotonergic receptors, the **WAY-100635** (0.1 mg / kg) for 15 consecutive days. Each group was divided at random into two, seven males of each treatment were evaluated in the **SA** and the other 7 males of each treatment were evaluated in the **MPCA**, in order to

determine whether rapid ejaculation having males in **MPCA** is due to the involvement of these receptors and thus check **Theoretical Validity** criteria. The results of this experiment showed that treatment of **WAY-100635**, male rats gradually increased their ejaculation latency in the **MPCA**, reaching levels similar to those presented by males treated with saline in the **SA** values, therefore this proved our arena meets the criteria of Theoretical Validity. Finally, the third experiment was administered to two groups of male rats, saline, one and the other, a selective serotonin reuptake inhibitor, **Dapoxetine** (30 mg / kg), in order to determine whether rapid ejaculation presented by males in the **MPCA**, slows the administration of this drug, which is currently the most widely used clinically for the treatment of PE and thus validate our model criteria **Predictive Validity** proposed by Willner. In this experiment we found that indeed, with the administration of Dapoxetine males were not shown rapid ejaculation, which was shown in the **MPCA**, Predictive Validity criteria. Therefore in this doctoral research found that the **MPCA**, might be a more complete experimental model for evaluation of rapid ejaculation in the rat because it meets the three criteria proposed by Willner: **Validity of Appearance, Theoretical and Predictive**.

3. INTRODUCCIÓN

Diversos modelos animales, incluyendo a la rata, han sido utilizados en el estudio de la conducta sexual desde la década de los 40's, a partir de los pioneros estudios de Beach en 1947. Estos modelos animales también han permitido estudiar diferentes trastornos sexuales como la disfunción eréctil, la eyaculación retardada o la **eyaculación precoz (EP)**. Sin embargo, los modelos animales que se utilizan actualmente en el estudio de la EP han tenido resultados diversos debido a que cumplen parcialmente con los criterios de validación para modelos animales los cuales fueron propuestos por Willner en 1984. El objetivo de la presente tesis fue validar un modelo animal diseñado en nuestro laboratorio, la **Arena de Selección Múltiple de Pareja (ASMP)** como modelo para evaluar la eyaculación rápida en la rata valorando si satisface los criterios de **Validez de Apariencia, Teórica y Predictiva** propuestos por Willner. En esta tesis se describen los parámetros y patrones que despliega la rata en un registro de conducta sexual masculina (**CSM**) en la **AT**. Posteriormente, se describe el proceso fisiológico de la eyaculación, así como la propuesta teórica que postulo el Dr. Walldinger en 1998 para la etiología de la EP. Finalmente se hace una descripción de los criterios de validación para modelos animales, así como una descripción del modelo animal existente para la evaluación de la eyaculación rápida, para tener un marco teórico de referencia que permita comprender el objetivo de los tres experimentos propuestos que se incluyen en esta tesis.

4. DESCRIPCIÓN DE LA CONDUCTA SEXUAL MASCULINA DE LA RATA MACHO ADULTA

4.1. *Patrones copulatorios de la rata macho adulta.*

La conducta sexual masculina (CSM) de la rata consiste en una serie de parámetros estereotipados los cuales difieren cualitativa y cuantitativamente (Larsson, 1979; Agmo, 1997). La CSM se compone de tres fases: a) la fase de precópula donde el macho olfatea el área genital de la hembra y mediante la percepción de feromonas le permite al macho determinar si la hembra se encuentra sexualmente receptiva. Durante esta etapa, la hembra realiza patrones de proceptividad como son pequeños brincos (hopping), movimiento de las orejas (ear wiggling) y carreritas en zig – zag (darting) (Hilnak, 1986); b) la fase de cópula se caracteriza por una serie de patrones que el macho realiza los cuales son: la monta, la intromisión y esta fase termina con la eyaculación del macho (Fig. 1); c) la fase de postcópula, se caracteriza porque el macho, después de presentar un periodo refractario de inactividad sexual, lleva a cabo el acicalamiento de sus genitales (Agmo, 1997).



MONTA



INTROMISIÓN



EYACULACIÓN

Fig. 1. Patrones conductuales que despliega la rata macho durante el registro de la Conducta Sexual Masculina en la Arena Típica (Fotografías tomadas por Ferreira Nuño y Olayo Lortia, 2015).

4.2. Evaluación de la conducta sexual de la rata en una Arena Típica.

Los registros de la **CSM** de la rata macho se realizan en un cilindro de acrílico transparente de 40 cm de alto x 30 cm de diámetro en el cual se introduce al macho y a una hembra ovariectomizada tratada previamente con benzoato de estradiol y progesterona para inducir su receptividad. La receptividad femenina se evalúa con la respuesta de lordosis, que consiste en el arqueamiento de la columna de la hembra, la elevación de la cabeza y zona perineal y el movimiento lateral de la cola para que el macho pueda intrometerla.

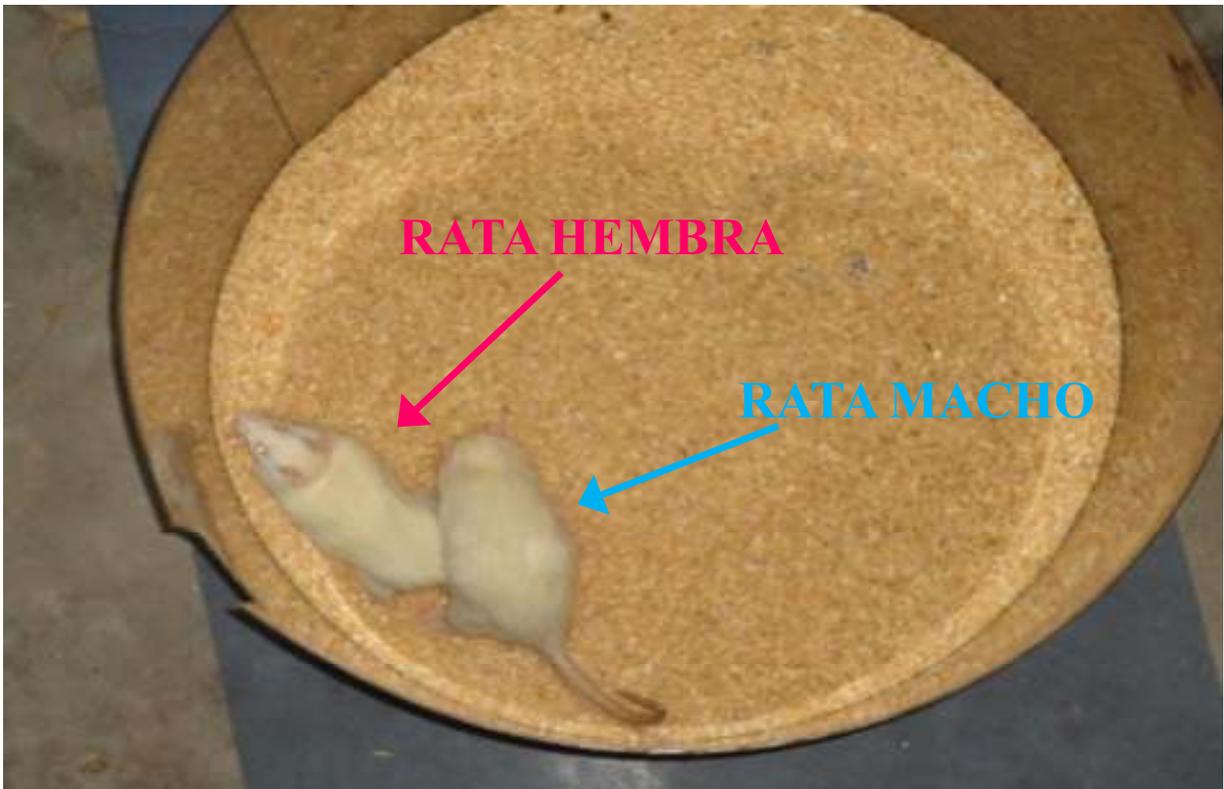


Fig. 2. Vista superior de la Arena Típica (AT) de registro de la CSM donde la hembra no tiene escapatoria y el macho lleva el ritmo de la cópula (Fotografía tomada por Morales Otal y cols. 2013).

Los registros de la **CSM** de la rata macho se realizan en un cilindro de acrílico transparente de 40 cm de alto x 30 cm de diámetro en el cual se introduce al macho y a una hembra ovariectomizada tratada previamente con benzoato de estradiol y progesterona para inducir su receptividad. La receptividad femenina se evalúa con la respuesta de lordosis, que consiste en el arqueamiento de la columna de la hembra, la elevación de la cabeza y zona perineal y el movimiento lateral de la cola para que el macho pueda intrometerla.

La evaluación de la **CSM** en una arena típica de registro de conducta sexual (**AT**, Ver Fig. 2) consiste en un registro de 30 min de duración, en el que se registran los parámetros y patrones copulatorios de la rata macho adulta.

La **AT** consiste en un redondel de acrílico de plexiglass de 40 cm de alto x 30 cm de diámetro, dentro de la arena el piso cuenta con una cama de aserrín para roedores. El macho es colocado durante 5 minutos para su habituación y posteriormente es introducida la hembra para el registro de **CSM**, la hembra no tiene escapatoria y es el macho quien regula la cópula (Ver Fig. 2).

Durante la cópula el macho despliega patrones estereotipados que se mencionan a continuación.

Monta: Movimiento pélvico suave, donde no hay inserción del pene en la vagina de la hembra (Fig. 1).

Intromisión: Movimiento pélvico más profundo hacia adelante, lo que permite que haya una inserción vaginal del pene, seguido de una brusca desmonta de la hembra, luego de la cual el macho generalmente lame sus genitales. Durante la cópula el macho repite los

patrones de monta e intromisión al azar de 6 a 12 veces antes de realizar el patrón de eyaculación (Fig. 1).

Eyaculación: Durante la eyaculación el macho realiza movimientos pélvicos profundos y espasmódicos en donde suele ocurrir la emisión del semen dentro de la vagina de la hembra y concluye con un movimiento pélvico más profundo que dura aproximadamente 3 segundos, el macho levanta sus patas delanteras y desmonta lentamente a la hembra (Fig. 1).

Después de la eyaculación ocurre un periodo de inactividad sexual llamado Periodo Refractario Post-eyaculatorio (**PRPE**), tiempo durante el cual el macho no responde a ningún estímulo sexual desplegado por la hembra. El PRPE tiene una duración aproximada de 5 minutos (Agmo, 1997).

A toda la serie de eventos copulatorios que van desde que el macho realiza la primera monta hasta que ocurre la eyaculación se le denomina *serie eyaculatoria*, mientras que a la serie de eventos copulatorios donde además, se incluye al periodo refractario post-eyaculatorio se le denomina *serie copulatoria*.

4.3. Parámetros de la conducta sexual masculina de la rata macho adulta que se utilizan para evaluar el componente motivacional y el componente ejecutorio.

En un registro de **CSM** de 30 min generalmente, se registran una serie de eventos llamados parámetros y patrones, estos se emplean para la evaluación de la **CSM** en una **AT** (Fig. 3).

Parámetros de la Conducta Sexual Masculina de la Rata

Latencia de monta (LM): este parámetro se refiere al tiempo que tarda el macho en montar por primera vez a la hembra desde que esta es introducida en la AT.

Latencia de Intromisión (LI): se refiere al tiempo que tarda el macho en intrometer por primera vez a la hembra desde que esta es introducida en la AT.

Número de montas (NM): es el número de veces que el macho monta a la hembra antes de la eyaculación.

Número de intromisiones (NI): es la cantidad de montas con inserción del pene en la vagina de la hembra que realiza el macho antes de la eyaculación.

Latencia de Eyaculación (LE): es el tiempo comprendido desde la primera intromisión hasta el tiempo en el que ocurre la eyaculación.

Periodo refractario posteyaculatorio (PRPE): es el tiempo que transcurre desde que el macho eyacula hasta la intromisión de la siguiente serie eyaculatoria.

Frecuencia Eyaculatoria (FE): es el número de eyaculaciones que ocurren durante el tiempo de registro de la CSM.

Después del registro de CSM se calculan otros índices que son utilizados para evaluar el desempeño copulatorio del macho dentro de los cuales están:

Tasa de Aciertos o Hit Rate (HR): $NI / NI + NM$

Esta operación da un valor máximo de 1, este índice predice la eficiencia copulatoria del macho. Por ejemplo, si un macho realizará sólo intromisiones el HR daría como resultado 1 lo que indicaría que en la medida que el macho tiene menos montas se considera que tiene un mejor desempeño para copular.

Intervalo Inter-intromisión (III): LE / NI

Es el tiempo que tarda una rata macho en intrometer y volver a intrometer. Este índice es útil para evaluar el componente motivacional (Agmo, 1997).

Intervalo Inter-copulatorio (IIC): $LE / NM + NI$

Este indicador es útil para evaluar el tiempo que pasó entre las montas e intromisiones precedentes a la eyaculación.

Umbral Eyaculatorio: Se define por el número de intromisiones NI que preceden a la eyaculación y/o la latencia de tiempo que comprende, del inicio de la cópula hasta momento de la eyaculación. Este indicador es útil para evaluar la facilidad con el que macho consigue eyacular, de tal forma que si se reduce el NI el umbral eyaculatorio será menor (Agmo, 1997; de Jong y cols. 2005).

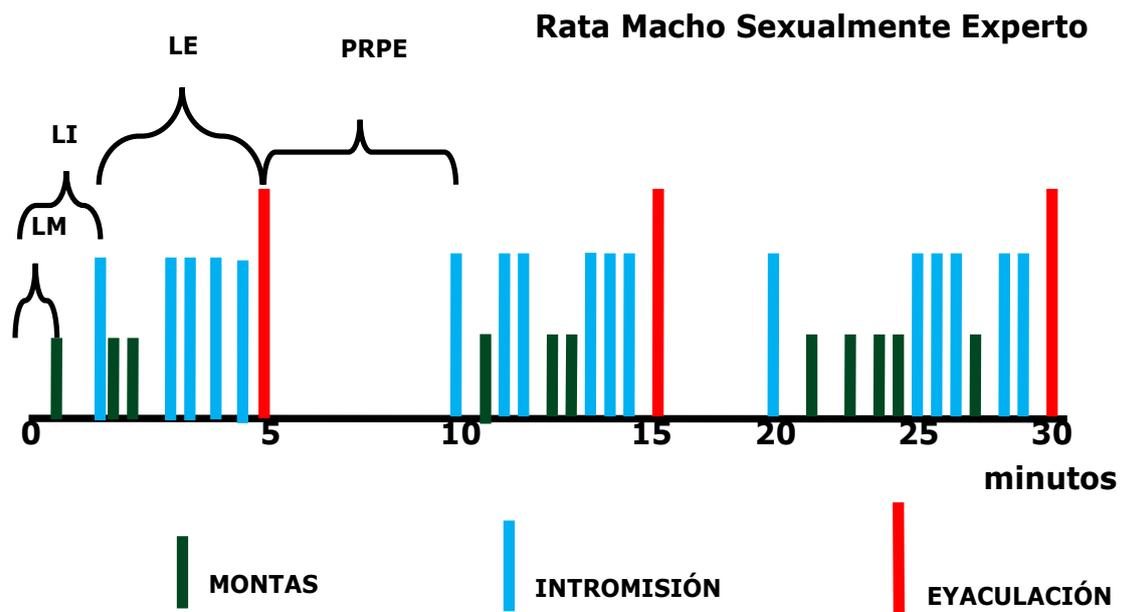


Fig. 3. Representación gráfica que muestra los eventos que ocurren durante la cópula de una rata macho adulta sexualmente experta. Se observan los patrones y parámetros que se evalúan en un registro de CSM en la AT durante 30 minutos. En barras amarillas se representan las montas, en azul las intromisiones y en rojo las eyaculaciones. LM: Latencia de Monta, LI: Latencia de Intromisión, LE: Latencia de Eyacuación; PRPE: Periodo Refractario Posteyaculatorio.

5. EYACULACIÓN

5.1. Definición y Componentes.

La eyaculación es un mecanismo fisiológico complejo que involucra al sistema nervioso central (SNC), sistema autónomo, órganos del sistema muscular, próstata y uretra. Este fenómeno fisiológico consiste de dos fases: *la Emisión y la Expulsión*. Los órganos involucrados en la fase de emisión comprenden: el epidídimo, los vasos deferentes, las vesículas seminales, la próstata, el glande, la uretra prostática y el esfínter vesical. Mientras que, los órganos que participan en la fase de expulsión son: el esfínter vesical, la uretra y los músculos pélvicos estriados (MacKenna, 1999).

5.1.1. Fase de emisión

La emisión consiste en la expulsión de los espermatozoides hacia la uretra posterior, donde se mezclan con los productos secretados por las glándulas sexuales accesorias. En la fase de emisión además de la secreción de los fluidos seminales provenientes de las glándulas sexuales accesorias, ocurre también el cierre del esfínter vesical para garantizar la expulsión del semen desde el meato uretral. Esto evita que el eyaculado retroceda a la vejiga (Giuliano & Clément, 2005).

Durante la fase de emisión, la secreción del epitelio de las glándulas sexuales y la contracción del músculo liso, se lleva a cabo en las vías seminales (Amelar & Hotckis, 1965). Todos los órganos que participan en la fase de emisión reciben una numerosa inervación del sistema nervioso autónomo compuesta por los axones simpáticos y parasimpáticos, principalmente procedentes del plexo pélvico (en ocasiones referido como

plexo hipogástrico inferior). En los humanos, el plexo pélvico se sitúa en el área retroperitoneal, en el plano sagital a ambos lados del recto, localizado lateral y posteriormente a las vesículas seminales (Véase Fig. 4, Schlegel & Walsh, 1987). Este plexo pélvico contiene fibras nerviosas provenientes del nervio pélvico e hipogástrico (Keast, 1995). El papel predominante de la fase de emisión es realizado por los nervios simpáticos con sus respectivas terminaciones, los cuales liberan norepinefrina, acetilcolina, oxitocina, factores como el ATP, neuropéptido Y, el péptido vasoactivo intestinal (VIP) y el óxido nítrico. Todos actúan como reguladores secundarios de la eyaculación dentro de las glándulas sexuales (Wang y cols. 1994). El estímulo de los genitales, es esencial para activar los receptores sensoriales que se encuentran integrados en la médula espinal y estimulan la emisión (Ver Voort, 1987).

5.1.2. Fase de expulsión

La expulsión representa la salida del esperma proveniente de la uretra hacia el glande. Durante esta fase se llevan a cabo contracciones rítmicas en el músculo liso de la uretra y en los músculos perineales estriados tales como los músculos isquiocavernoso y bulbocavernoso, que dan como resultado la expulsión rápida del semen. Esta respuesta tiende a ser constante y consiste de 10 a 15 contracciones (Young, Coolen & McKenna, 2009).

La expulsión, es un reflejo de la médula espinal que ocurre cuando la eyaculación llega a un punto donde al parecer, ya no puede revertirse. Durante la fase de expulsión, las fibras musculares lisas del esfínter de la vejiga se contraen para prevenir que el eyaculado fluya hacia la vejiga (Young, Coolen & McKenna, 2009).

El músculo bulbo esponjoso y el músculo isquiocavernoso participan primordialmente en el despliegue de las contracciones rítmicas, para propulsar el semen a lo largo de la uretra bulbar y peneana. Hasta la fecha, no hay datos contundentes que demuestren un control voluntario de la fase de expulsión en los humanos (Gerstenberg, Levin & Wagner, 1990).

Existen varios artículos científicos que sugieren que los mecanismos neuronales responsables de la generación de la respuesta eyaculatoria residen en la médula espinal. En los humanos, la estimulación del pene a través de vibraciones es suficiente para inducir la eyaculación en individuos con una transección completa de la médula espinal en el décimo nivel segmentario torácico (Sønksen, Biering-Sørensen & Kristensen, 1994; Brackett y cols. 1998; Biering-Sørensen y cols. 2005). Sin embargo, en ratas anestesiadas se ha demostrado el patrón de eyaculación después de una transección de la médula espinal a nivel torácico. Estos datos sugieren que la emisión de los reflejos y las contracciones pélvicas asociadas con la fase de expulsión de la eyaculación pueden ser realizadas a pesar de la pérdida completa de la conectividad con las estructuras supraespinales. Parece probable que los componentes neuronales responsables de la generación de la eyaculación residan en la médula espinal lumbosacra. También hay indicios de la existencia de un centro de coordinación de estos reflejos espinales, del cual se ha hecho referencia con distintos nombres, pero quizás el más utilizado hasta el momento es el *generador espinal de la eyaculación* (MacKenna, 1999).

5.1.3. Control neural de la eyaculación

La eyaculación está neuromodulada por mecanismos que ocurren en el SNC y sistema nervioso periférico. Las estructuras involucradas en este reflejo, han sido descritas por Coolen (2005). Estudios de mapeo neuronal que emplean la expresión de **C-Fos** como marcador de activación neuronal, han puesto de manifiesto las regiones que muestran actividad durante la expresión de diferentes elementos de la conducta sexual (Veening & Coolen, 1998; Coolen, Peters, & Veening, 1997). Los resultados demostraron que varias subdivisiones dentro del Área preóptica media (**APM**), Núcleo de la cama de la estría terminal (**NCST**), Amígdala media (**AM**) y el tálamo posterior despliegan actividad durante las distintas fases de la conducta sexual, que incluyen patrones como la investigación anogenital de la hembra, la monta, la intromisión y la eyaculación (Coolen, Peters & Veening, 1996, 1997, Fig. 4). Sin embargo, algunas regiones del **APM**, **NCST** y del **AM** han sido asociadas exclusivamente con la activación inducida por la eyaculación, revelando que no existe actividad de estas áreas durante otros elementos de la conducta sexual masculina (Veening & Coolen, 1998; Coolen, Peters & Veening, 1997; Coolen y cols. 2003). Este subcircuito neuronal específico para la eyaculación, está localizado en regiones dentro de la **AM**, el **NCST** y una porción medial del Núcleo talámico parvocelular subparafascicular (**SPFp**) (Ver Fig. 4). Sin embargo, a pesar de que estas regiones siempre han sido asociadas con la eyaculación por la expresión de C-Fos, una serie de publicaciones de Coolen y cols. en las que utilizaron técnicas de lesión en estas áreas han sugerido que estas estructuras supraespinales pueden estar participando en el relevo de la información relacionada con la cópula, en lugar de tener un papel activo en la generación del patrón eyaculatorio (Coolen, 2005). De hecho, es posible que algunas de estas estructuras puedan

estar involucradas con la conducta inhibitoria asociada con el **PRPE**, periodo en el que la rata no tiene actividad sexual inmediatamente después de la eyaculación. Rodríguez Manzo y cols. en 2000 han demostrado mayor actividad del **APM** en sujetos sexualmente saciados; aunque hay que señalar que no se revelaron efectos sobre el comportamiento sexual en los sujetos saciados después de la manipulación ya sea eléctrica o química del **APM** (Mas y cols. 1995; Marson & McKenna, 1996; Rodríguez-Manzo y cols. 2000).

A pesar de estos reportes, se han hecho muchas suposiciones en relación a que un generador espinal de la eyaculación se encuentra en la médula espinal, ya que es una región que mantiene la conectividad de la región supraespinal con aquellas áreas neuronales que despliegan una mayor actividad durante el patrón eyaculatorio. Estudios de los órganos pélvicos con trazadores radioactivos han revelado una población de interneuronas espinales que intervienen con las neuronas motoras pudendales así como con neuronas autonómicas preganglionares (Marson, Platt & McKenna, 1993; Marson & McKenna, 1994, Fig. 4). De las estructuras supraespinales mencionadas anteriormente, el **SPFp** ha sido de particular interés, ya que se encuentra anatómicamente colocado entre las estructuras fundamentales de la médula espinal que participan en la generación de la conducta eyaculatoria y las demás estructuras supraespinales (Coolen, Peters & Veening, 1998; Coolen & Wood, 1998). Esta posibilidad surgió de estudios donde se descubrió la conectividad entre la subdivisión medial del **SPFp** y una población de interneuronas de la médula espinal lumbar, en los niveles 3 y 4, llamadas Neuronas espinotalámicas lumbares (**ETLs**) (Coolen y cols. 2003, 2005) (Véase Fig. 4) porque se encuentran ubicadas anatómicamente en la región lumbar de la médula espinal con proyecciones hacia el tálamo. Las células **ETLs** se concentran en las láminas 10 y 7 en todo el canal central de la médula espinal. Esta

localización parece coincidir con un grupo de neuronas que expresan los neuropéptidos: Galanina y Colecistoquinina (CCK) y cuyos axones terminan en la región medial del **SPFp**. Además las fibras que expresan Galanina descubiertas en la región media del **SPFp**, muestran una alta correlación con la localización de neuronas positivas a **C-Fos** involucradas en la conducta eyaculatoria. Estos hallazgos apoyan la existencia de una vía espinotalámica para la activación neuronal asociada con la conducta sexual (Coolen y cols. 2003).

Además de las conexiones supraespinales, las células **ETLs** mantienen proyecciones neuronales con el parasimpático, con las neuronas preganglionares del simpático, con las motoneuronas pudendas y se encuentran anatómicamente localizadas para recibir los estímulos sensoriales a través del nervio pudendo (De Groat & Steers, 1990; Allard y cols. 2005). Claramente, estas células exhiben una adecuada conexión con el relevo de las señales involucradas en la conducta sexual. Por otro lado, el análisis de la actividad celular indicada por el marcador **C-Fos** muestra que la activación neuronal de las células **ETLs**, se lleva a cabo durante la eyaculación y no en otra fase de la conducta sexual (Truitt y cols. 2003).

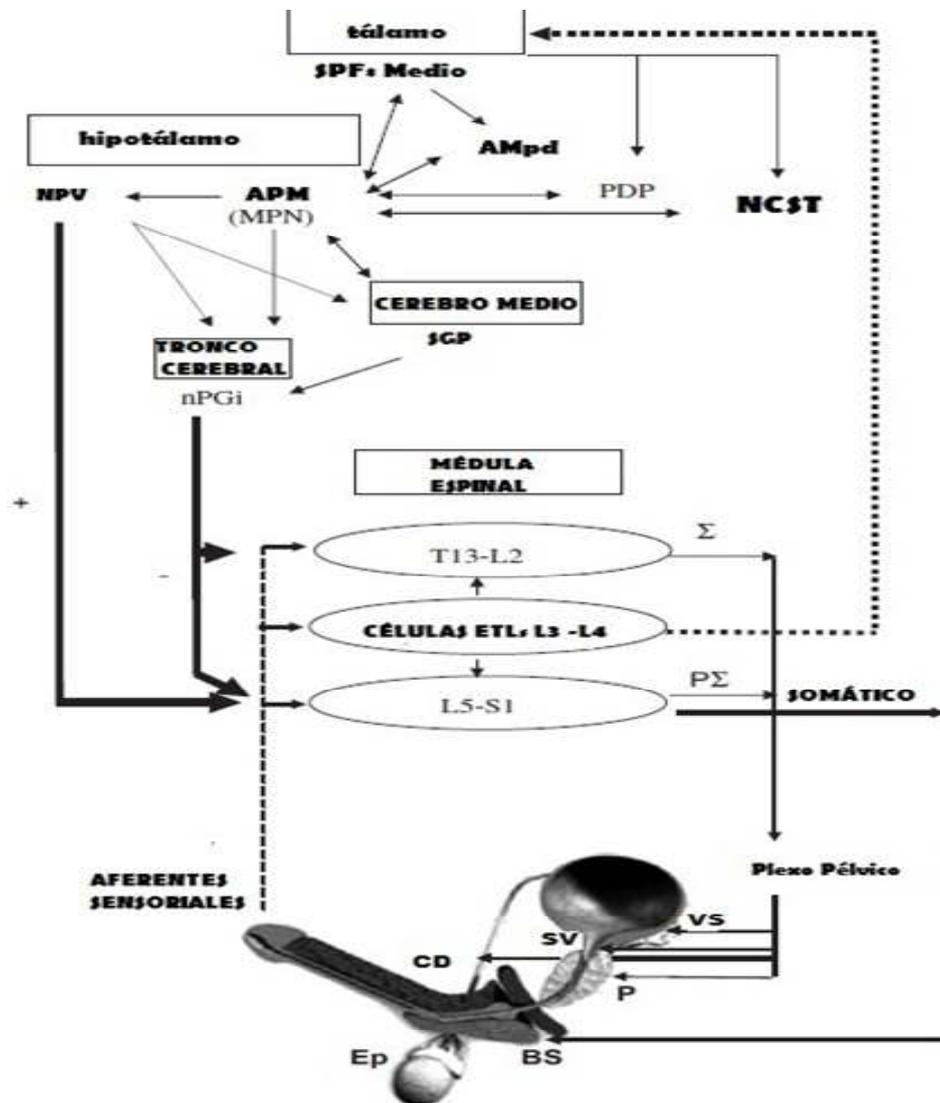


Fig. 4. Circuito neuronal y estructuras cerebrales que participan en la eyaculación. Abreviaciones: Ep., Epidídimo; BS, Músculo bulbo esponjoso; P, Próstata; VS, Vesícula seminal; CD, Conducto Deferente; SV, Esfínter Vesical (Modificado de Peeters y Giuliano, 2008).

De manera muy resumida el mecanismo eyaculatorio comprende tanto áreas y receptores sensoriales, vías aferentes, centros motores cerebrales, centros motores espinales y vías eferentes (Fig. 4). La neuroquímica de este mecanismo involucra una interacción entre el sistema dopaminérgico y serotoninérgico, con participación secundaria de neuronas de tipo colinérgicas, adrenérgicas, oxitonérgicas y gabaérgicas.

Varios neurotransmisores están involucrados en el control de la eyaculación (McMahon y cols. 2013). De los diversos estudios que han sido dirigidos para esclarecer el papel del cerebro en el despliegue de las distintas fases de la conducta sexual, la serotonina y la dopamina son los factores neuroquímicos esenciales, particularmente en el de la **Eyaculación** (Coolen, 2005).

5.1.4. Sistemas de neurotransmisión involucrados en el control de la eyaculación

Sistema Dopaminérgico

Se ha demostrado que la dopamina participa primordialmente en el despliegue de la conducta sexual masculina (Peeters & Giuliano, 2008). En los últimos años se han desarrollado numerosas investigaciones para una mejor comprensión de la neurofisiología y farmacología de la eyaculación, proporcionando una nueva perspectiva de los eventos fisiológicos que ocurren en este fenómeno. El estudio del Sistema nervioso central (SNC) y el área de las Neurociencias es un prometedor campo para el desarrollo de innovadores enfoques terapéuticos para tratar la disfunción de la Eyaculación. Las evidencias de que la Dopamina está implicada en la regulación de la conducta sexual masculina y en particular, en la eyaculación, han sido reportadas desde la década de los 70's, donde se han obtenido

efectos facilitadores de la conducta sexual al estimular los receptores dopaminérgicos (Giuliani, Ottani & Ferrari, 2002).

Receptores Dopaminérgicos

Basándose en criterios anatómicos, biológicos, farmacológicos y fisiológicos, han sido identificados 2 grandes familias de receptores dopaminérgicos con 5 subtipos diferentes de receptores dopaminérgicos en los mamíferos (Peeters & Giuliano, 2008).

Estos receptores están clasificados en receptores tipo D₁ (D₁ y D₅) y receptores tipo D₂ (D₂, D₃ y D₄). Todos estos receptores pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas G, también llamados la familia de los siete dominios transmembranales (Seeman y cols. 1975). Los receptores tipo D₁ estimulan la acumulación del adenosín monofosfato cíclico (**AMPC**) por el acoplamiento de la proteína G_{αs} mientras que la unión de agonistas dopaminérgicos en los receptores tipo D₂ activa la proteína G_{αi/o} que inhibe la acumulación de **AMPC** (Neve, Seamans & Trantham-Davidson, 2004).

Receptores Dopaminérgicos y Eyaculación

Estudios realizados hace 30 años sustentan el papel facilitatorio del sistema dopaminérgico en la conducta sexual masculina de la rata, especie donde se ha demostrado que la administración de apomorfina (agonista del receptor D₁/D₂) disminuye el número de intromisiones que preceden a la eyaculación, además de una reducción significativa de la latencia de eyaculación. Este efecto parece estar regulado por los receptores de dopamina, ya que el efecto puede ser revertido por un potente bloqueador de los receptores dopaminérgicos, la pimozida (Paglietti y cols. 1978).

La identificación de los diversos subtipos de receptores dopaminérgicos y el desarrollo de ligandos selectivos, han demostrado los efectos de estos receptores en la conducta sexual masculina (Peeters & Giuliano, 2008).

Receptores tipo D₁

Los receptores tipo D₁ se encuentran de manera considerable en el caudado putamen, núcleo Accumbens y en el tubérculo olfatorio, así como también en la corteza cerebral, sistema límbico, hipotálamo, tálamo y axones nigroestriales de la sustancia nigra reticulada (Mengod y cols. 1989). Adicionalmente, los receptores tipo D₁ han sido identificados en la Sustancia gris periacueductal (SGP) y las regiones parvo y magnocelular del Núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) (Czyrak y cols. 2000, ver Fig. 5). Este último se ha vinculado como el facilitador de la emisión seminal durante la eyaculación (Pehek, Thompson & Hull, 1989). Los receptores D₅ se expresan en la corteza basal, ganglio basal, cerebelo, hipocampo, hipotálamo y tálamo. Es importante mencionar que la dopamina tiene una mayor afinidad por los receptores D₅ que por los receptores D₁ (Ciliax y cols. 2000).

En los estudios conductuales que han evaluado la regulación de los receptores tipo D₁, se observó que al administrar sistémicamente el antagonista de los receptores tipo D₁, el *SCH 23390*, se presenta una reducción en el número de intromisiones que preceden a la eyaculación y en la frecuencia de eyaculación en pruebas de conducta sexual masculina en la rata (Pfaus & Phillips, 1991).

Por otro lado, el único estudio que ha evaluado el efecto de los receptores D₅ en la eyaculación, se realizó en ratones knockout para este receptor (**D₅KO**) (Kudwa y cols.

2005). Los resultados obtenidos no demostraron ninguna diferencia en la latencia de eyaculación, ni en la frecuencia de eyaculación en los ratones D₅KO con respecto de los ratones silvestres, indicando que el receptor D₅ no tiene participación en la eyaculación.

Receptores tipo D₂

Los receptores D₂ se encuentran expresados en caudado putamen, núcleo Accumbens, hipotálamo, hipófisis y tubérculo olfatorio (Mengod y cols. 1989, Fig. 5), así como en las dendritas dopaminérgicas de la Sustancia nigra compacta (**SNC**) y en la región dorsal del Área ventral tegmental del hipotálamo (**AVT**) (Akaoka y cols. 1992). Por otra parte, los receptores D₃ se expresan en regiones del cerebro como el núcleo Accumbens, tubérculo olfatorio y los islotes de Calleja (Bouthenet y cols. 1991). Esta localización de los receptores D₃ en las áreas del sistema límbico del cerebro indican una participación de este receptor en la locomoción y, posiblemente, en las conductas de reforzamiento y recompensa, tales como la conducta sexual masculina (Hitchcott, Bonardi, & Phillips, 1997).

Los receptores D₄ están presentes en la corteza frontal, hipocampo, hipotálamo, cerebro medio, amígdala y médula (Van Tol y cols. 1991). La distribución de los receptores tipo D₂ se ha identificado en núcleos que se encuentran regulando la eyaculación, como la AM, el NCST, la APM y la SGP (Yokoyama y cols. 1994, Fig. 5). Numerosos estudios conductuales han evaluado la regulación de los receptores tipo D₂ administrando sistémicamente agonistas de estos receptores, como el SND 919 y el quinelorano, demostrando el papel clave que desempeñan en la facilitación de la emisión seminal (Bitran y cols. 1989). También estos estudios se realizaron en ratas sexualmente activas y

no activas, donde se observó una reducción en la latencia de eyaculación (Ferrari & Giuliani, 1996). Por otro lado, ratas anestesiadas a las que se les administró intracerebroventricularmente quinerolano, presentaron contracciones rítmicas del músculo bulboesponjoso. Este compuesto se ha considerado como un marcador fisiológico de la fase de expulsión de la eyaculación (Clément y cols. 2006). Poco después de que Ahlenius & Larsson (1995) publicaron la identificación del subtipo D₃ administraron sistémicamente **7-OH-DPAT** (agonista para este receptor) observando un efecto facilitador en la conducta sexual masculina de la rata, al reducir el número de intromisiones y la latencia de eyaculación. Adicionalmente, en un estudio reciente para evaluar la participación del receptor D₃ como promotor de la eyaculación, se administró por vía intracerebroventricular inyecciones de 7-OH-DPAT a ratas anestesiadas, observando la respuesta de eyaculación en estas ratas durante la anestesia (Clément y cols. 2007). Dadas las características mostradas por el receptor D₃ y de acuerdo a los resultados de estas investigaciones, se ha propuesto al receptor D₃ como un agonista importante en el tratamiento de diferentes disfunciones de la eyaculación en humanos. Hasta el 2015 y después de revisar varios artículos en revistas indexadas, no existen reportes en los que se asocie al receptor D₄ en la eyaculación.

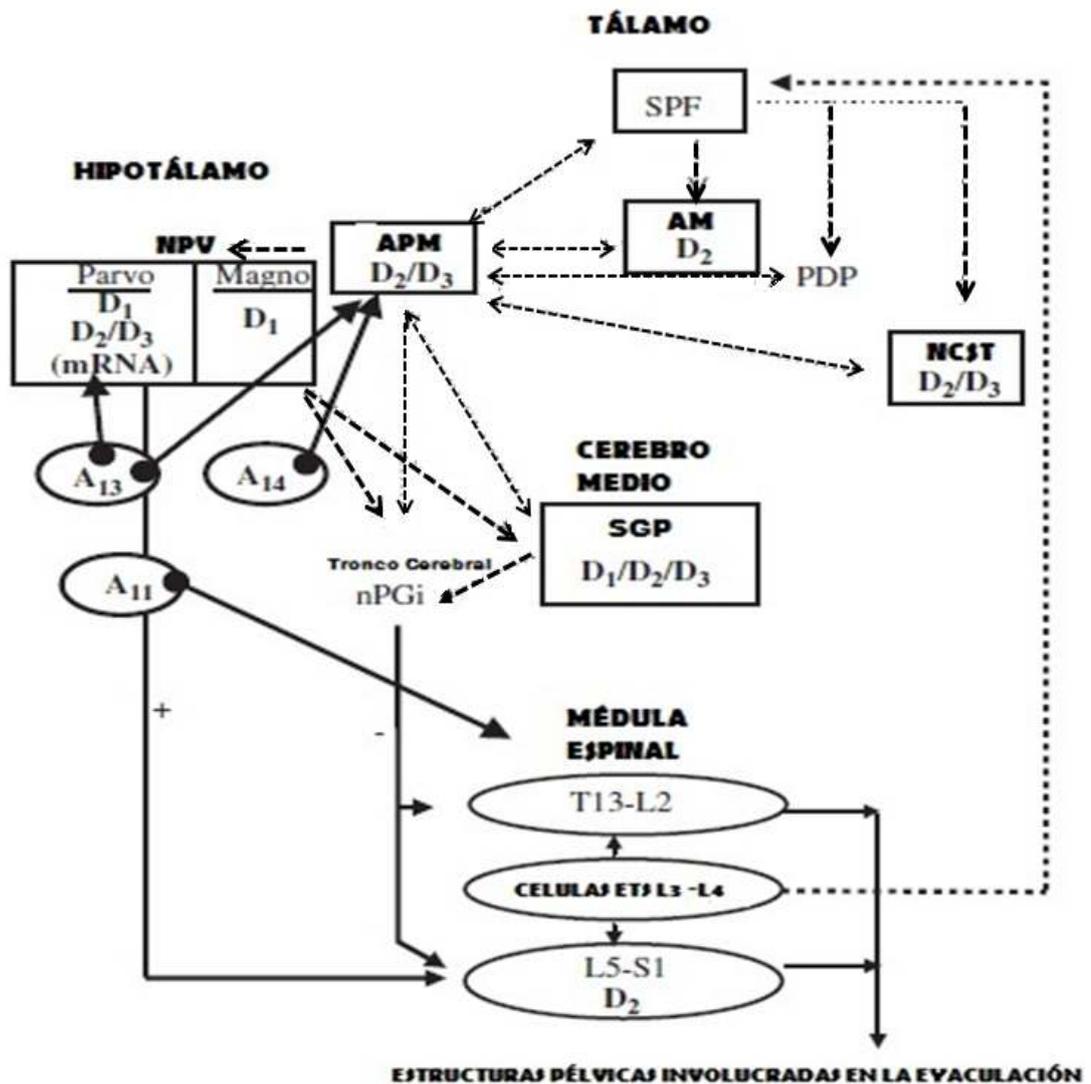


Fig. 5. Localización de los diferentes receptores dopaminérgicos D₁, D₂ y D₃ en el circuito neuronal de la eyaculación. Abreviaciones: SPF, núcleo subparafascicular del tálamo; AM, amígdala Media; NPV, núcleo paraventricular; APM, área preóptica mediana; nPGi; Núcleo paragigantocelular; SGP, sustancia gris periacueductual; NCST, núcleo de la cama de la estria terminal; PDP, núcleo preóptico posterodorsal; A₁₁, zona del diencéfalo espinal, A₁₃, zona dorsomedial del hipotálamo; A₁₄, zona periventricular (Modificado de Peeters & Giuliano, 2008).

Sistema Serotoninérgico

En las últimas décadas, se han realizado una serie de investigaciones sobre la participación que tiene la serotonina, así como sus respectivos receptores en la regulación de la eyaculación, hasta el momento se han reportado 14 subtipos de receptores para este neurotransmisor (Waldinger & Olivier, 1998).

Receptores de Serotonina

Los receptores de la serotonina están clasificados en 7 familias que van de la familia 5HT₁ a la familia 5HT₇. Estos diferentes subtipos de receptores tienen una distribución limitada y distinta a lo largo del sistema nervioso central (Pytliak y cols. 2011). La evidencia de que la serotonina está implicada en el mecanismo que regula la eyaculación ha alentado a los investigadores a determinar cuáles receptores de la serotonina contribuyen en este componente de la conducta sexual masculina. La innovación en el desarrollo de agonistas y antagonistas selectivos de estos receptores han proporcionado un auge sobre el conocimiento de las funciones de los subtipos de receptores específicos que intervienen en la regulación de la eyaculación (de Jong y cols. 2006).

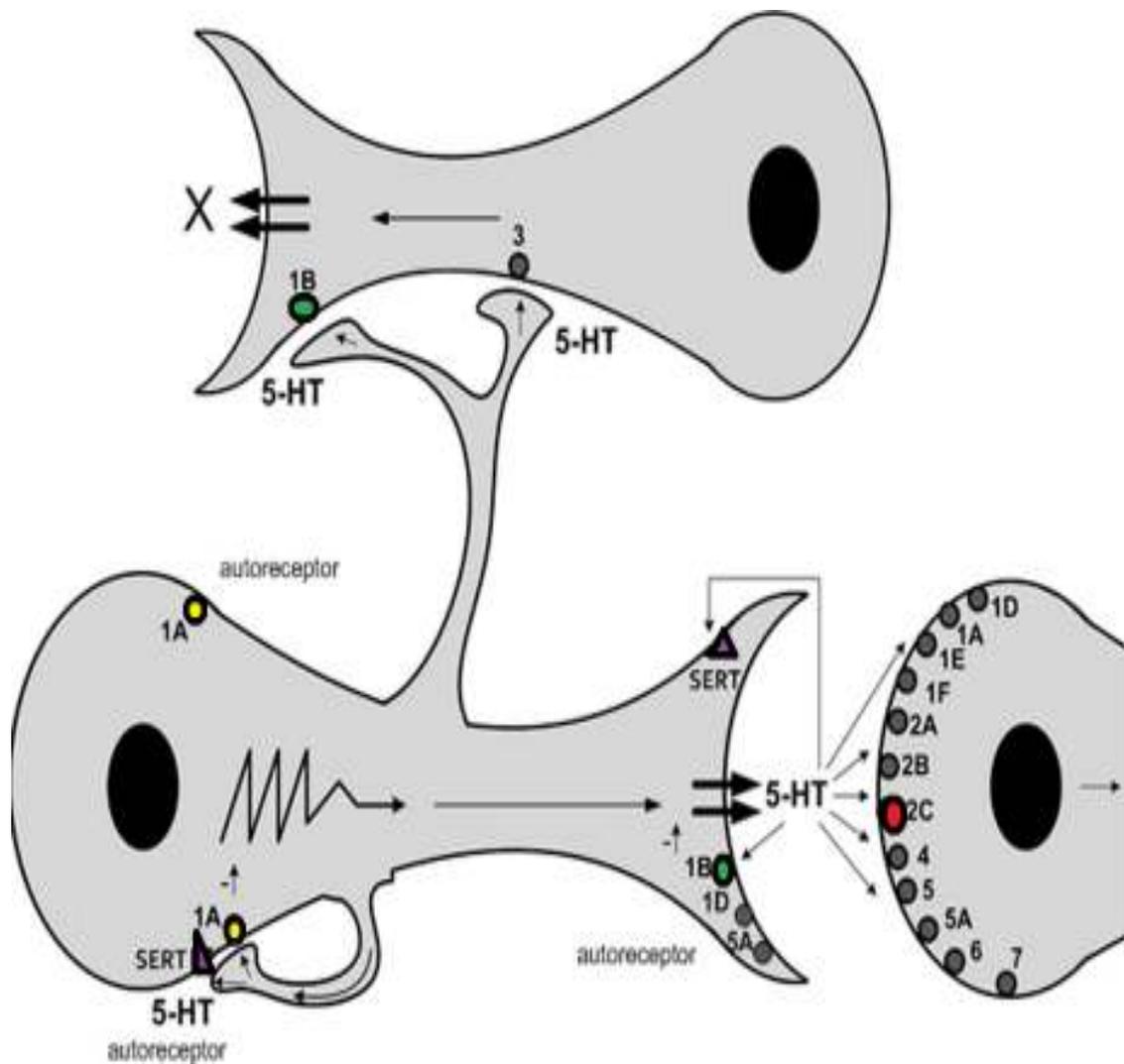


Fig. 6. Esquema de la Sinapsis Serotoninérgica, en donde se muestra la ubicación de los principales receptores serotoninérgicos involucrados en la eyaculación. En círculos amarillos se representa al receptor 5-HT_{1A}; en círculos verdes al receptor 5-HT_{1B} y el círculo rojo representa al receptor 5-HT_{2C}, en triángulos morados se muestra al transportador de la recaptura de serotonina (SERT) (Imagen Modificada de Snoeren y cols. 2014).

Receptores de Serotonina y la Eyaculación

Se ha demostrado que los subtipos 5HT_{1A}, 5HT_{1B} y 5HT_{2C} son los subtipos de receptores de serotonina que modulan a la eyaculación (de Jong y cols. 2006).

Receptor 5HT_{1A}

El receptor 5HT_{1A} se encuentra en el soma, en las dendritas de las neuronas serotoninérgicas presinápticas y en las neuronas postsinápticas que contienen una amplia variedad de neurotransmisores (Filip & Bader, 2009, ver Tabla 1, Fig. 6). La activación de los receptores presinápticos 5HT_{1A}, produce una inhibición en la frecuencia de disparo de las neuronas serotoninérgicas, que constituyen un sistema de retroalimentación negativa, mediante la inhibición de la liberación de serotonina en las áreas donde se encuentra proyectada (Piñeyro & Blier, 1999).

La activación del receptor 5HT_{1A} postsináptico, puede dar lugar a una amplia variedad de acciones, dependiendo de las propiedades electrofisiológicas y de los neurotransmisores utilizados por las neuronas postsinápticas. A través de técnicas de tinción para el ARNm de este receptor se ha demostrado que estos se localizan en los núcleos del rafe y en el Núcleo paragigantocelular (**NPG**) (Pompeiano, Palacios & Mengod, 1992), donde es probable que actúe sobre neuronas serotoninérgicas presinápticas. El receptor 5HT_{1A} de tipo postsináptico está distribuido a través del cerebro, incluyendo estructuras cerebrales involucradas en la eyaculación como el **APM**, el hipotálamo lateral, la **AM**, el **NCST**, núcleo Accumbens, **NPV** y el núcleo arcuato hipotalámico (Aznar y cols. 2003).

La activación selectiva del receptor $5HT_{1A}$, tiene un efecto fundamental en la eyaculación. En el primer estudio donde se administró sistémicamente un agonista del receptor $5HT_{1A}$, el 8-OH-DPAT, se observó una reducción en el umbral eyaculatorio al disminuir el número de intromisiones y en la latencia de eyaculación de la rata (Ahlenius y cols. 1981; Sura, Overstreet & Marson, 2001). Se ha reportado que microinyecciones de **8-OH-DPAT** en el núcleo medio del rafe, reducen la latencia de eyaculación y el número de intromisiones (Hillegaart, Ahlenius & Larsson, 1991), mientras que la misma inyección en el núcleo dorsal del rafe, no tuvo efectos sobre la conducta sexual masculina (Fernández Guasti y cols. 1992). Sin embargo, los efectos de los agonistas del receptor $5HT_{1A}$ no son iguales en todas las especies. Por ejemplo, la administración sistémica de **8-OH-DPAT** inhibe la eyaculación en ratones, conejos, perros y hurones, mientras que en ratas se facilita la eyaculación; esta diferencia radica en la distribución postsináptica de los receptores $5HT_{1A}$ (Price y cols. 1996).

Estos resultados muestran evidencias de que la activación del receptor $5HT_{1A}$ es importante para el control de la eyaculación ya que cuando los niveles de serotonina son elevados y en combinación con un mal funcionamiento del receptor $5HT_{1A}$ inhiben la eyaculación. Este efecto podría ser la base que sustenta el uso de los Inhibidores Selectivos de la Recaptura de Serotonina (ISRS) para retardar la eyaculación, ya que estos compuestos podrían estar actuando a través de la desensibilización del receptor $5HT_{1A}$ (Li, Battaglia & Van de Kar, 1997).

Receptores 5HT_{1B}

El receptor 5HT_{1B} está ubicado en axones terminales pre y post-sinápticos, donde se encargan de regular la liberación de serotonina en el espacio sináptico (Sari, 2004, Fig. 6). El receptor 5HT_{1B} está localizado en el núcleo del rafe, hipotálamo lateral, **NCST**, núcleo Accumbens, NPV y núcleo arcuato hipotalámico (Makarenko, Meguid & Ugrumov, 2002, Tabla 1, Fig. 7).

La inyección sistémica de anpirtolina, un agonista del receptor 5HT_{1B} aumenta la latencia de eyaculación y el número de intromisiones, la cual puede revertirse por varios antagonistas de los receptores 5HT_{1B} (Hillegaart & Ahlenius, 1998). Adicionalmente, la inyección sistémica de trifluorometilfenilpiperazina (**TFMPP**), un agonista mixto de receptores 5HT_{1B}/5HT_{2C}, reduce el porcentaje de sujetos que eyaculan. En cambio, la inyección local de TFMPP en el núcleo Accumbens o en el **APM** aumenta la latencia de eyaculación (Fernández Guasti y cols. 1992).

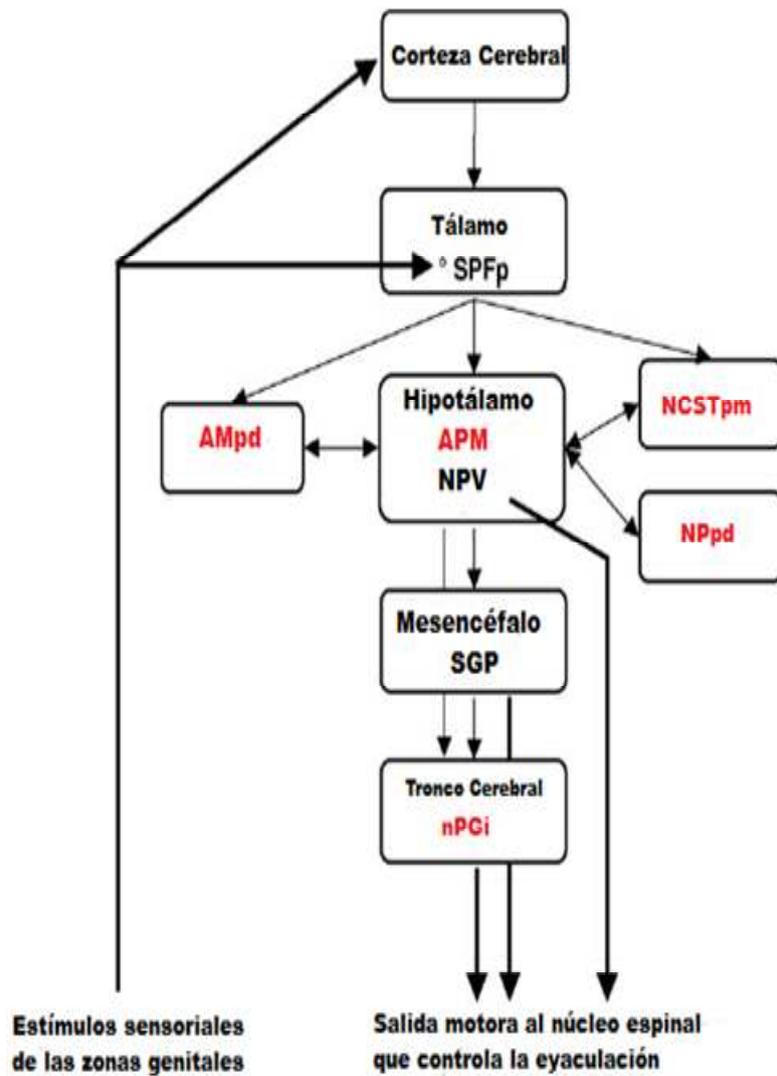


Fig. 7. Circuito neuronal de la eyaculación. Se muestra en rojo las áreas cerebrales donde actúa la serotonina. Abreviaciones: AMpd, amígdala media posterodorsal; SPFp, núcleo subpraparafascicular; NCSTpm, núcleo de la cama de la estría terminal posteromedial; APM, área preóptica media; NPpd, núcleo preóptico posterodorsal; SGP, sustancia gris periacueductual; nPGI; núcleo paragigantocelular (Modificado de: Giuliano & Clément, 2005).

Los posibles mecanismos por los cuales los receptores 5-HT_{1B} inhiben la eyaculación aún no han sido demostrados. El papel que tiene como autorreceptor es poco probable, ya que estos receptores provocan una reducción en la liberación de serotonina en donde se esperaría que se redujera el umbral eyaculatorio. Pero por otro lado es probable que el receptor 5-HT_{1B} inhiba la liberación de otros neurotransmisores que facilitan la eyaculación, tales como la acetilcolina (Durán, Gil, & Cueva-Rolón, 2000), glutamato (Sari, 2004) o tal vez galanina (Coolen y cols. 2005), en el cerebro y la médula espinal áreas que participan en la umbral eyaculatorio.

Receptores 5HT_{2C}

Los receptores 5HT_{2C} han sido encontrados en las dendritas postsinápticas (Fig. 7). La participación de estos receptores no se ha asociado con la autorregulación de serotonina (Pytliak y cols. 2011). Estos receptores 5HT_{2C} están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central, incluyendo el núcleo del Rafé, APM, AM, NCST, núcleo Accumbens y el núcleo hipotalámico arcuato (Clément y cols. 2006, Tabla 1, Fig. 7).

Los reportes científicos donde se ha evaluado la participación de este receptor en la eyaculación son escasos, En estudios donde se administró sistémicamente el (+) 2,5-dimetoxi-4-iodofenil) 2-aminopropano HCL (DOI), un agonista no selectivo del receptor 5HT_{2C}, se demostró una reducción significativa del porcentaje de sujetos que eyacularon y un aumento en la latencia de eyaculación. Estos efectos pudieron ser revertidos mediante la administración con varios antagonistas del receptor 5HT_{2C} como la clozapina (Klint & Larsson, 1995). Hasta el momento, no es del todo claro cuál es el mecanismo de acción que interviene para que el receptor 5HT_{2C} aumente la latencia de eyaculación. Sin embargo, la

presencia de este receptor en diversas áreas espinales y supraespinales involucradas en la eyaculación ofrecen numerosas opciones para la investigación de los efectos de este receptor (de Jong y cols. 2006).

Algunos estudios neuroanatómicos que se han realizado con serotonina han demostrado que su liberación es provocada en respuesta a la eyaculación, para inhibir la cópula durante el intervalo post-eyaculatorio. Aunque la mayor parte de la información recabada proviene de estudios neuroanatómicos o experimentos psicofarmacológicos sobre el papel de la serotonina en la eyaculación, la combinación de ambos campos del conocimiento son necesarios para mejorar el entendimiento de los efectos que tiene el sistema serotoninérgico en el control de la eyaculación (de Jong y cols. 2006).

Tabla 1. Localización de los diferentes receptores 5HT que se asocian a la eyaculación (Modificado de Giuliano y Clément 2005).

Subtipo de receptor 5HT.	Localización Tisular.	Localización Celular.	Efectos sobre la eyaculación.
5HT_{1A}	Cerebro (MRN, Acumb) Médula espinal (CD, CDG, NDL, NIML, NPE)	Somatodendrítico Pre/Postsináptico	Facilitador ¿?
5HT_{1B}	Cerebro (Hipotálamo) Médula Espinal (CD, CDG, NDL, NDM, NIML, NPE)	Presináptico Pre/postsináptico	Inhibitorio Inhibitorio
5HT_{2C}	Cerebro (Hipotálamo) Médula Espinal (CDG, NPE)	Postsináptico Postsináptico	Inhibitorio Inhibitorio

Abreviaturas: Acumb., núcleo Accumbens; CDG, comisura dorsal gris; CD, cuerno dorsal; NDL, núcleo dorso lateral; NDM, núcleo dorsomedial; NIML, núcleo intermedio lateral; NMR, núcleo medio del rafe; NPE, núcleo parasimpático espinal.

La dopamina y la serotonina participan de manera diferente en la neuroquímica del mecanismo fisiológico de la eyaculación, ya que comprenden áreas y receptores sensoriales, vías aferentes, centros motores cerebrales, centros motores espinales y vías aferentes distintas; por lo tanto esta red es una compleja interacción entre ambos sistemas, dopaminérgico y serotoninérgico. Por un lado la dopamina tiene un efecto facilitador de la eyaculación, mientras que la serotonina tiene un efecto inhibitorio sobre la eyaculación.

Hay muchos trabajos que se han enfocado a demostrar estas funciones, sin embargo, todavía falta por realizar estudios de investigación científica básica, clínica y aplicada en la participación de estos sistemas de neurotransmisión en la eyaculación. El conocimiento de los mecanismos de acción de estos neurotransmisores a través de la administración de fármacos en modelos animales de eyaculación precoz, es indispensable para la generación de opciones terapéuticas, que se puedan emplear en el tratamiento de las disfunciones sexuales asociadas a este fenómeno.

En esta tesis hemos hecho mención sobre los dos sistemas de neurotransmisión involucrados en el control neural de la eyaculación, siendo el serotoninérgico el que tiene una participación primordial en la inhibición de la eyaculación. De tal forma que el desarrollar modelos animales con los que se puedan estudiar los mecanismos de acción de la serotonina y sus receptores proporcionarán resultados importantes para entender la fisiología, los fármacos potenciales y actualmente utilizados, además del desarrollo de tratamientos efectivos y económicos para la eyaculación precoz.

5.2. Eyaculación precoz.

5.2.1. Definición y Etiología

El Manual Estadístico de Trastornos Mentales (DSM IV, 2000) define a la EP como un trastorno sexual que se caracteriza por: a) ser un patrón recurrente, b) suceder ante un mínimo estímulo, ya sea antes o inmediatamente después de la penetración del pene en la vagina, c) ocurrir mucho antes de que el sujeto lo desee y d) presentarse antes de dos minutos de haber iniciado la cópula. Las personas que cursan con este padecimiento también, presentan otros trastornos como ansiedad elevada, estrés e inclusive depresión debido al malestar que les genera este trastorno sexual (McMahon y cols. 2013).

Los datos de prevalencia de la eyaculación precoz son variables debido a que no todas las personas acuden a consulta médica para tratar este trastorno, además de que en algunos casos los métodos de diagnóstico son escasos. De acuerdo con datos de la Asociación Mundial de Salud Sexual, uno de cada tres hombres en el mundo ha tenido síntomas de EP en algún momento de su vida. Mientras que **uno de cada siete** hombres presentan EP durante toda su vida sexual (McMahon y cols. 2013).

Por otro lado, los registros del último Censo Nacional de Población del INEGI realizado en el 2010 en México, mostró que de un total de 55 millones de habitantes hombres, 13 millones de ellos, han sido diagnosticados con algún síntoma relacionado con la EP. En estudios científicos donde se ha analizado el impacto que tiene esta disfunción sexual sobre la calidad de vida de los pacientes que la padecen y sus parejas, han demostrado que en países donde la educación sexual es deficiente, los hombres no tratan su padecimiento por la vergüenza de acudir con el médico (Graziottin & Althof, 2011).

México, no cuenta con un buen programa de educación sexual y muchos hombres desconocen las causas y los tratamientos que pueden seguir para poder solucionar su problema de EP.

Se han postulado diferentes teorías sobre la etiología de la EP, las cuales se pueden clasificar en psicológicas y biológicas (McMahon y cols. 2013).

Dentro de las teorías psicológicas se encuentran las siguientes: a) experiencias sexuales negativas o traumáticas, b) condiciones de premura o inapropiadas para llevar a cabo la relación sexual c) ansiedad elevada durante la relación, d) empleo de técnicas sexuales promotoras de la eyaculación, como alguna posición sexual donde la estimulación facilite la eyaculación, y e) baja frecuencia de la actividad sexual, debido a un periodo de abstinencia prolongada.

Las teorías biológicas se refieren: a) la hipersensibilidad del pene, b) bajo umbral del reflejo eyaculatorio, c) respuesta rápida a la excitación sexual y d) la alteración de los niveles de neurotransmisores centrales y la sensibilidad de sus receptores (Walldinger y Olivier, 1998). Siendo esta última la teoría biológica que más explica la etiología de la eyaculación precoz (McMahon y cols. 2013).

5.2.2. Teoría de la participación serotoninérgica en la etiología de la eyaculación precoz

La serotonina participa en el control de varios procesos fisiológicos como son: el hambre y el estado de ánimo, el control de la temperatura corporal, los procesos de sueño–vigilia y la inhibición de la eyaculación.

Actualmente se sabe que las neuronas que inhiben la eyaculación mediante la liberación de serotonina, se localizan en el NPG del mesencéfalo cerebral. En estas neuronas, cuando la serotonina es liberada al espacio sináptico ésta se une al receptor 5HT_{2C}, localizado en la membrana de la neurona postsináptica, para inducir el efecto fisiológico de inhibir la eyaculación. Una vez que la serotonina actúa sobre el receptor, se libera de este y es metabolizada por enzimas como la monoaminoxidasa (MAO) que convierte la serotonina en 5-hidroxi-indoleacetaldehído en el espacio sináptico. Por otro lado la serotonina también es recapturada por la neurona presináptica a través de una proteína que se encarga de transportarla al interior de esta célula, de tal forma que regula la cantidad de serotonina disponible en el espacio sináptico. También, la serotonina puede modular su liberación a través del autoreceptor 5HT_{1A} que se ubica en la neurona presináptica, cuando la serotonina se une a este autoreceptor inhibe la liberación de serotonina al espacio sináptico, lo que permite que exista un equilibrio en la cantidad de serotonina disponible en el espacio sináptico, por lo que al tener poca cantidad de serotonina se estimula la eyaculación (Pattij, Olivier & Waldinger, 2005).

En 1998, Marcel Waldinger propuso que la eyaculación precoz puede deberse a un desbalance en la sensibilidad de dos receptores serotoninérgicos, por lo que podrían estar

ocurriendo las siguientes dos condiciones: a) una hipersensibilidad de los autoreceptores 5HT_{1A}, que al evitar la liberación de serotonina, facilita la eyaculación y/o b) una hiposensibilidad de los receptores 5HT_{2C}, ubicados en la neurona postsináptica, lo que ocasiona que la serotonina no sea captada en niveles suficientes para que se pueda dar la inhibición de la eyaculación (Waldinger & Olivier, 1998).

6. MODELOS ANIMALES

6.1. Función y empleo de los modelos Animales.

Un modelo animal con importancia biológica y/o clínica en neurociencias, es un organismo vivo utilizado para estudiar las relaciones cerebro – conducta en condiciones controladas, con el objetivo de estudiar y entender la fisiología en los seres humanos (van der Staay, Arndt & Nordquist, 2009a).

Debido a la importancia que tiene desarrollar fármacos más efectivos y económicos para el tratamiento de la EP, se han realizado investigaciones en diferentes modelos animales, siendo la rata el principalmente utilizado, dado las características neuroquímicas de sus receptores.

La rata es un animal ampliamente utilizado en la investigación básica, debido a que su mantenimiento es económico y requiere de poco espacio para su crianza y desarrollo. Además, muchos de los procesos fisiológicos que se llevan a cabo en la rata, son similares a los que ocurren en el ser humano. Por ejemplo, la CSM de la rata, ha sido uno de los

modelos biológicos más empleado en neurociencias, para desarrollar medicamentos para el tratamiento de diferentes disfunciones sexuales (Olivier y cols. 2006).

Las razones por las cuales la rata es utilizada en investigaciones relacionadas con la conducta sexual son diversas, dentro de las cuales está que las intromisiones y el patrón eyaculatorio es claramente discernible, además de que en la rata y en el humano la latencia de eyaculación está en un promedio de alrededor de los 5 minutos a diferencia de otras especies, como en el ratón donde el número de intromisiones y la latencia de eyaculación es variable. Otra característica que permite trabajar con la rata macho es que tiene contactos más reducidos con la hembra entre cada monta e intromisión, además tienen múltiples eyaculaciones durante la cópula (Hull & Domínguez, 2007), alrededor de 3 eyaculaciones en 30 min de registro conductual.

En los laboratorios de investigación, el registro de la conducta sexual masculina en la rata se realiza en una AT. Posteriormente, se registra durante 30 minutos los parámetros de CSM anteriormente expuestos en el primer capítulo. Durante este periodo, generalmente la rata macho adulta realiza en promedio 3 a 4 eyaculaciones si es un macho sexualmente experto (Olivier y cols. 2006; Hull & Domínguez, 2007; Ferreira Nuño y cols. 2010).

En el caso de la EP, al igual que con otros padecimientos, se ha intentado desarrollar modelos animales cada vez más completos y poderosos, con el fin de que estos puedan proporcionar mayor información sobre este fenómeno fisiológico y así poder diseñar fármacos más eficaces y económicos.

Estudios preclínicos utilizando a la rata han demostrado el diferente grado de respuesta a fármacos como los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS) y en los

que se ha obtenido un efecto diferente como con: la fluoxetina, sertralina, paroxetina entre otros dependiendo la dosis y el esquema del tratamiento (Moss y cols. 1999). En otros modelos se ha estudiado el efecto de compuestos que facilitan la eyaculación como el 8-OH- DPAT (Ahlenius y cols. 1981) en los que el comportamiento de las ratas es similar al de la eyaculación precoz en el humano.

6.2. Criterios de validación de modelos animales.

Para que un modelo animal pueda ser utilizado de acuerdo con criterios establecidos por Paul Willner (1984), un modelo animal potencialmente más eficiente debe de satisfacer ciertos criterios de consideración, los cuales Willner los definió como: a) Validez de Apariencia, b) Validez Teórica y c) Validez Predictiva.

En el caso de la EP, un modelo animal cumple el criterio de **Validez de Apariencia** en la medida en que reproduce este padecimiento, esto significa que las ratas macho se deben comportar como eyaculadores rápidos, es decir ratas machos que tengan una disminución en la latencia de eyaculación. Para comprobar que el modelo animal cumple con el criterio de **Validez Teórica**, las ratas macho sexualmente expertas deben aumentar su latencia de eyaculación, mediante la administración de algún fármaco utilizado como tratamiento de la EP, cuya acción estuviera de acuerdo con la teoría actual que explica este desorden o trastorno, como la teoría propuesta por Waldinger en 1998.

Por último, el criterio de **Validez Predictiva**, se refiere a la capacidad que tiene el modelo animal para responder a fármacos que tiene la finalidad de regular el trastorno o fenómeno fisiológico a estudiar. En la validez predictiva, lo que se quiere demostrar en el modelo animal es que sea simple y práctico, para que se puedan obtener resultados en un

corto plazo; es decir que se innoven fármacos en menos de 5 años y puedan utilizarse en el tratamiento de la enfermedad o padecimiento, además que estén disponibles en la clínica en el menor tiempo posible (Akiskal, 1980). En el caso de la EP, el modelo animal cumplirá con este criterio en la medida en que se retarde la eyaculación de la rata, empleando los mismos fármacos que actualmente se emplean en el hombre para el tratamiento de la EP.

6.3. Modelo actual para la eyaculación precoz en la rata.

Actualmente, el modelo animal que se emplea para evaluar la EP, consiste en una AT, como la que se describió anteriormente, en la que se registra durante 30 minutos la conducta sexual masculina de ratas expertas.

Una vez que se obtiene el registro basal de su conducta sexual, se les administran a estas ratas macho los fármacos que tienen la capacidad de retardar su eyaculación y, si estos fármacos son efectivos, se determinan la dosis y el periodo o duración que debe tener el tratamiento para conseguirlo (Olivier y cols. 2006). Este modelo animal ha demostrado satisfacer la Validez Predictiva propuesta por Willner, en la medida en que se ha logrado retardar la eyaculación de las ratas macho, empleando fármacos que alteran la transmisión serotoninérgica, que teóricamente se ha postulado que participan en la inhibición de la eyaculación, o con ISRS, que son drogas capaces de retrasar la también la eyaculación en el hombre. Sin embargo, este modelo propuesto hace 10 años no cumple con la Validez de Apariencia ni la Validez Teórica, en la medida en que las ratas macho no eyaculan más rápido desde el inicio, sino que más bien eyaculan en un periodo más prolongado que el habitual, cuando se les administran estos fármacos. Por lo tanto resulta necesario y

primordial diseñar una arena o modelo animal que sea potencialmente efectivo y cumpla con los tres criterios de Validación.

6.4 *La Arena de Selección Múltiple de Pareja (ASMP).*



Fig. 8. Vista superior de la ASMP que consiste en 4 redondeles de acrílico dispuestos de manera circular, en la base de cada redondele hay una puerta por la cual debido a su tamaño solo puede pasar una hembra, en cada uno de los redondeles se coloca a un macho sexualmente experto el cual está confinado a su correspondiente redondele (Ferreira Nuño y cols. 2005).

Nuestro grupo de investigación en el 2005, desarrolló un nuevo modelo biológico al que llamamos ASMP (Ferreira Nuño y cols. 2005), que consiste en 4 redondeles de acrílico de 50 cm de diámetro x 40 cm de alto dispuestos de manera circular (Fig. 8). Cada uno de estos redondeles tiene en su base una compuerta de 3 cm de ancho por 4 cm de alto, por donde solamente puede atravesar una rata hembra debido a su menor tamaño. En cada uno de estos redondeles se coloca a un macho sexualmente experto; mientras que en el centro de la arena se introduce a una rata hembra receptiva, para que pueda elegir libremente con cuál de los 4 machos copula, saliendo y entrando de los redondeles. En estas condiciones, aunque la hembra muestra una preferencia por sólo uno de los machos, suele visitar a los otros 3, durante el tiempo que dura la prueba; estas condiciones genera entre los 4 machos una competencia, que da como resultado un incremento en la ansiedad. Cuando las ratas macho son sometidas a copular con la hembra en la ASMP, este ambiente competitivo genera en los machos ansiedad o estrés, que las estimula a eyacular más rápido y a requerir de un menor número de intromisiones que preceden a la eyaculación. En un estudio realizado por nuestro grupo de trabajo (Ferreira Nuño y cols. 2010) se demostró que las ratas macho sexualmente expertas cuando son evaluadas en la ASMP, eyaculan más rápido. Los resultados mostraron el tiempo total que permanece la hembra en el interior de cada uno de los redondeles, hasta que cada macho eyacula. Inmediatamente, que sale la hembra del redondel se cierra esta compuerta, con el objetivo de que la hembra interactúe con los otros 3 machos y estos eyaculen. Por lo tanto, con los antecedentes antes mencionados sobre la participación de la serotonina en el control inhibitorio de la eyaculación y con los hallazgos obtenidos en trabajos previos con la ASMP, el objetivo de este trabajo de investigación que culmina en una tesis es demostrar a través de tres

experimentos, que la ASMP cumple con los diferentes criterios de validación propuestos por Paul Wilner y tomando en cuenta nuestros resultados, poder proponer que la ASMP pueda ser un Modelo Animal más completo que el actual, en el que se evalúe el efecto que tienen los fármacos sobre la conducta sexual de la rata macho en condiciones típicas, además de ser de gran utilidad en la comprensión y bases fisiológicas de la EP. Resulta de bastante consideración citar que actualmente (2015) los fármacos que se utilizan en el tratamiento de la EP son muy costosos y de tratamiento crónico. Por lo tanto el utilizar modelos animales para el diseño de fármacos más eficaces y económicos para la EP sería muy importante para la salud sexual y calidad de vida del hombre y de la pareja.

7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Considerando que hasta el momento no existe un modelo en el que la rata macho eyacule rápidamente de manera espontánea y no existen fármacos eficaces que retarden la eyaculación de las ratas. Es posible que la ASMP pudiera ser un modelo experimental más completo para evaluar las características que presentan las ratas al comportarse como eyaculadores rápidos, además de corroborar el efecto de agonistas y antagonistas serotoninérgicos que participan en la inhibición de la eyaculación. Por lo tanto, sería de gran utilidad comprobar la potencia de la arena de selección múltiple de pareja desarrollada en nuestro laboratorio y comprobar su posible aplicación en el conocimiento de los mecanismos de la EP en el humano.

8. HIPÓTESIS

La ASMP cumplirá con los criterios de validez de apariencia, teórica y predictiva como modelo animal para evaluar la eyaculación precoz.

9. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este estudio es evaluar si la ASMP cumple con los criterios de validez de apariencia, teórica y predictiva, como modelo animal para evaluar la eyaculación precoz.

9.1. Objetivos Particulares.

a) Comprobar que la ASMP cumple con el criterio de Validez de Apariencia, si los machos se comportan como eyaculadores rápidos en esta arena en comparación con la AT e independientemente del orden, en que se evalúen los machos en las diferentes arenas.

b) Demostrar que el modelo de la ASMP cumple con el criterio de Validez Teórica, si al administrar un antagonista selectivo de los receptores $5HT_{1A}$ (WAY - 100635), los machos dejan de comportarse como eyaculadores rápidos en esta arena.

c) Evidenciar que la ASMP cumple con el criterio de Validez Predictiva, si al administrar el inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina (Dapoxetina), los machos dejan de comportarse como eyaculadores rápidos en esta arena.

10. METODOLOGÍA GENERAL

10.1. Animales: obtención y mantenimiento.

Ratas macho adultas (de 470 ± 70 g de peso) y ratas hembras de la cepa Wistar (de 200 ± 50 g de peso), provenientes del Bioterio de la UAM-Iztapalapa, fueron colocadas en cajas de plexiglas (40 cm x 30 cm x 40 cm, 5 ratas por caja), en un cuarto con temperatura controlada a 24 °C, con un fotoperiodo de luz/oscuridad 12/12 h (la luz se encendió a las 8 pm) y alimentadas *ad libitum* con pellets de Purina Chow Harlan y agua. Todos los experimentos y procedimientos realizados en este estudio fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa, de acuerdo con la Guía para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio y con la Norma Oficial Mexicana para el Uso y Cuidado de Animales (NOM-062-ZOO-1999).

10.2. Preparación de los animales experimentales y estímulo.

Veinte ratas hembras estímulo fueron anestesiadas con 0.3 ml de una mezcla de Ketamina /Xilacina (70 mg/ml y 6mg/ml, respectivamente), con el fin de ovariectomizarlas bilateralmente. Después de 2 semanas de recuperación, cada vez que se emplearon las hembras estímulo, estas fueron inyectadas por vía subcutánea con 10 µg de benzoato de estradiol (Sigma Aldrich) y 0.5 mg de progesterona (Sigma Aldrich), 48 y 4 horas respectivamente, antes de cada prueba de conducta sexual, con el fin de inducir la receptividad en las hembras. Antes de realizar cada prueba, se seleccionaron como hembras estímulo, aquellas que mostraron un cociente de lordosis (CL = número de lordosis/ 10 montas del macho) del 90 %.

Asimismo, para estandarizar la experiencia sexual de los machos empleados en este estudio, estos se aparearon cada tercer día, 3 veces en una semana, con ratas hembras estímulo tratadas con hormonas, con la finalidad de seleccionar a 20 machos sexualmente expertos, que eyacularan por lo menos en dos ocasiones en pruebas de quince minutos.

Habitación de los animales en la Arena de Selección Múltiple de Pareja (ASMP)

Con el objeto de habituar a hembras y machos a la ASMP, se realizaron los siguientes procedimientos. El modelo consiste de cuatro redondeles de acrílico transparente de 50 cm de alto x 40 cm de diámetro, agrupados de manera circular (véase Fig. 8). Al comienzo de cada prueba, en el centro de la arena se coloca a la hembra estímulo tratada previamente con hormonas. Cada redondel tiene en su base, un agujero de 3 cm de ancho por 4 cm de alto, por donde sólo la hembra puede pasar, por tamaño el macho no puede salir; de manera que la rata hembra controla la cópula. Estos agujeros de acceso y salida permiten que la hembra tenga cópula regulada, entrando y saliendo de los redondeles, además de preferir una rata macho sexualmente experta con quién copular.

En la primera prueba de habitación, se colocaron, a las 20 hembras estímulo por parejas en el área central de la ASMP, sin tratamiento hormonal, y se les dejó explorar los cuatro cilindros vacíos durante 15 minutos a cada pareja. En la siguiente prueba de habitación de quince minutos, a las 20 hembras estímulo se les administró el tratamiento hormonal, para inducir la receptividad. Posteriormente, se colocaron de manera individual en la zona central de la ASMP, pero con los accesos de los redondeles cerrados, durante 5 minutos. Antes de introducir a la hembra en el área central, en cada uno de los cuatro cilindros, se colocó a un macho sexualmente experto. Al final del periodo de habitación de

5 minutos, se extrajo a la hembra estímulo del área central y se abrieron las puertas de acceso de los redondeles, para permitir que la hembra pudiera seleccionar e interactuar con el macho de su preferencia. El objetivo de esta habituación fue que tanto machos como hembras reconocieran la arena y la asociaran con la actividad sexual y competencia que se establece entre los machos por la hembra.

11. PRIMER EXPERIMENTO: VALIDEZ DE APARIENCIA

Comparación de la conducta sexual masculina de dos grupos de ratas machos en una arena típica y en la arena de selección múltiple de pareja

11.1. Metodología del Primer Experimento.

Pruebas de Conducta Sexual en la Arena Típica (AT)

Para este experimento se utilizaron dos grupos de 10 machos sexualmente expertos. El primer grupo (GRUPO I, Fig. 9) de machos fue evaluado en su primera semana de registro en la AT. La prueba termino cuando el macho eyaculó por primera vez o bien que transcurrieran 30 minutos. Para ello, cada uno de los machos fue colocado dentro de una AT, como ya se describió anteriormente; con una cama de aserrín nueva y durante un periodo de habituación de cinco minutos. Al finalizar este periodo, se introdujo en el redondel, una hembra estímulo que tuviera un mínimo de CL del 90 %, además se registraron los siguientes parámetros: latencias de monta (LM) e intromisión (LI), número de montas (NM), y número de intromisiones (NI), que precedieron a la eyaculación; latencia de eyaculación (LE), tasa de aciertos (TA) o eficiencia copulatoria.

Posteriormente estos machos tuvieron una semana de descanso y fueron evaluados en la ASMP como se describe a continuación.

Pruebas de Conducta Sexual en la Arena de Selección Múltiple de Pareja (ASMP)

Una vez que fueron adaptados machos y hembras en la ASMP, se procedió a registrar la conducta sexual en esta arena. Para esta prueba fue importante que todos los machos tuvieran, por lo menos, una semana de inactividad sexual. En cada uno de los redondeles se introdujo a un macho sexualmente experto, con los agujeros de acceso cerrados, mientras que en el área central de la arena se colocó una hembra estímulo, durante un periodo de habituación de cinco minutos. Al finalizar este periodo, se extrajo a la hembra del área central y se giraron los redondeles para dejar libre las entradas de acceso que se encuentran en la base. Se introdujo nuevamente a la hembra en el centro de la arena y se registraron los siguientes parámetros: NM y NI que precedieron a la eyaculación de cada macho y se calculó la TA. También se registraron las LM, LI y LE, tomando en cuenta para ello, únicamente el tiempo total que permanece la hembra en el interior de cada uno de los redondeles.

Los machos se fueron descartando conforme obtuvieron su primera eyaculación. Posteriormente, se giró el redondel del macho que eyaculó, en el momento en que la hembra abandonó dicho compartimento, con el fin de que la hembra ya no pudiera copular con ese macho, sino con el resto de los machos de la arena. La prueba concluyó hasta que los cuatro machos eyacularon o bien después de 30 minutos de registro.

Tanto las pruebas en la AT, como en la ASMP se realizaron durante el periodo de oscuridad.

El segundo grupo (Grupo II, Fig. 9) de machos fue evaluado en su primera semana de registro en la ASMP, tal y como ya fue descrito anteriormente. Al término del registro los machos tuvieron una semana de descanso, pasando este tiempo, estos mismos machos fueron evaluados en la AT, siguiendo la misma metodología que se describió previamente en ambos casos.

12. SEGUNDO EXPERIMENTO: VALIDEZ TEORICA

Evaluación del efecto que tiene administración de un antagonista de los receptores serotoninérgicos 5HT_{1A}, sobre la conducta sexual masculina de la rata macho adulta, evaluadas en una arena típica y en la arena de selección múltiple de pareja.

12.1. Metodología del Segundo Experimento.

En este experimento se utilizaron 28 ratas machos y 20 ratas hembras Wistar adultas, los cuales fueron alojados y mantenidos en las mismas condiciones descritas en la metodología general.

Previo al estudio los 28 machos fueron divididos en dos grupos de 14 machos cada uno. Uno de estos grupos fue evaluado en la AT y el otro grupo fue evaluado en la ASMP hasta que alcanzaran su primera serie eyaculatoria o pasara media hora de registro. Lo anterior se hizo con la finalidad de tener el registro basal de la conducta sexual, en su correspondiente arena. Después de una semana, el primer grupo o vehículo (VEH, n = 14) recibió 0.03 ml de solución salina por vía subcutánea durante 15 días consecutivos,

mientras que el segundo grupo (grupo WAY, n =14), recibió 0.1 mg del antagonista 5-HT_{1A}, el N-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil] etil]-N-(2-piridinil) ciclohexano carboxamida 3HCl (WAY-100635; Sygma Aldrich) disuelto en 0.03 ml de solución salina, por vía subcutánea durante 15 días consecutivos de acuerdo con el tratamiento descrito por De Jong et al. 2005. Se seleccionaron al azar 7 machos de cada grupo, a los cuales se les evaluó la conducta sexual masculina en la AT; durante los días 1, 8, y 15 del tratamiento, la prueba termino hasta que los machos alcanzaron su primera eyaculación. Con los otros 7 machos, se les evaluó la conducta sexual masculina en la ASMP, durante 30 minutos o hasta que eyacularan. De tal forma que los grupos quedaron conformados de la siguiente manera: **AT-VEH**, **AT-WAY**, **ASMP-VEH** y **ASMP-WAY**. La administración del tratamiento se realizó una hora antes de iniciar el experimento. Los parámetros de la conducta sexual que se evaluaron en ambas arenas (AT y ASMP) fueron: LM, LI, LE, NM, NI y se calculó la TA. Además, en el registro de la conducta sexual masculina en la ASMP, se consideró únicamente el tiempo en que la hembra permaneció en cada uno de los redondeles de los machos, para poder establecer el tiempo real que permaneció en contacto con cada uno de ellos. Las pruebas conductuales, así como la administración diaria de las drogas se realizó durante la fase de oscuridad de las ratas.

13. TERCER EXPERIMENTO: VALIDEZ PREDICTIVA

Evaluación del efecto que tiene la administración de un inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina, sobre la conducta sexual masculina de la rata macho adulta en la arena de selección múltiple de pareja.

13.1. Metodología del Tercer Experimento.

En este experimento se utilizaron 14 ratas machos y 20 ratas hembras Wistar adultas, alojados y mantenidos en las mismas condiciones de Bioterio.

Administración del Inhibidor Selectivo de la Recaptura de Serotonina Dapoxetina

Luego de seleccionar a los machos sexualmente expertos, estos permanecieron una semana sin tener actividad sexual previo a la realización del experimento. Posteriormente, una hora antes del experimento se dividieron al azar a los 14 machos en dos grupos de 7 machos cada grupo. Una vez separados los grupos, los machos recibieron el siguiente esquema de tratamiento. El primer grupo o grupo Vehículo (VEH) recibió 5 ml de solución salina por vía oral, mientras que el segundo grupo (DAX) recibió por vía oral 30 mg/kg de Dapoxetina (Sigma Aldrich) en 5 ml de solución salina. Posteriormente se procedió a evaluar la conducta sexual de los machos en la ASMP. Después de la evaluación se dejó a los machos sin actividad sexual durante una semana y en la siguiente semana los esquemas de tratamiento fueron invertidos. De esta forma el primer grupo recibió 30 mg / kg de Dapoxetina (DAX) y el segundo grupo recibió el vehículo (VEH), ambos se administraron con la finalidad de observar si el efecto de la Dapoxetina administrada al segundo grupo en la primera semana, aún persistía sobre la conducta sexual de los machos una semana después.

14. ESTADÍSTICA

14.1. Análisis estadístico del Experimento 1: Validez de Apariencia.

Cada una de las medias de los diferentes parámetros de la conducta sexual obtenidos por los machos en cada arena (AT vs ASMP), se compararon mediante la prueba no paramétrica de los signos de Wilcoxon con el software GB – STAT Versión 10.0, y una U de Mann Whitney para comparar los parámetros obtenidos por los dos grupos diferentes en una misma arena (AT vs AT), a un nivel de significancia menor de 0.05.

14.2. Análisis estadístico del Experimento 2: Validez Teórica.

Cada una de las medias de los diferentes parámetros de la conducta sexual obtenidos por los grupos de machos, en cada arena a lo largo del tratamiento (días 1, 8 y 15) se compararon mediante una ANOVA de 2 Vías, seguida por la prueba Post-Hoc de Newman – Keuls, empleando el software de análisis estadístico SPSS Versión 21.0, a un nivel de significancia menor 0.05.

14.3. Análisis estadístico del Experimento 3: Validez Teórica.

Cada una de las medias de los diferentes parámetros de la conducta sexual obtenidos por los machos de cada tratamiento, se compararon mediante la prueba no paramétrica de U de Mann Whitney con el software SPSS Versión 21.0, a un nivel de significancia menor de 0.05.

15. RESULTADOS

15.1. Experimento 1: Validez de Apariencia.

Los resultados de la prueba de rangos con signo de Wilcoxon (Fig. 9), muestran que cuando los machos copulan en el ASMP (independientemente del orden en que se han probado en las dos arenas), presentan una disminución en la: LI, NI y LE, diferencias que fueron estadísticamente significativas cuando se compararon estos parámetros con respecto a la AT; LI (Grupo I, AT = 57.1 ± 6.15 seg vs ASMP = 4.7 ± 0.82 seg.; grupo II, ASMP = $3.3 \pm 0,48$ seg vs AT = 34.6 ± 5.6 seg, $p < 0.01$ en ambos grupos, Fig. 9 A, B) y NI (Grupo I, AT = 11 ± 1.3 vs ASMP = 6 ± 1.2 ; Grupo II , ASMP = 7.1 ± 1.19 vs AT = 10 ± 1.94 , $p < 0.05$ en ambos grupos, Fig. 9 C, D). Es considerable mencionar, que las ratas macho mostraron una mayor reducción en la LE ($p < 0.01$, Fig. 9 E, F) cuando se prueba por primera vez en la AT y después en la ASMP (685.34 ± 86.69 seg vs. 326.7 ± 37.13 seg, respectivamente) que cuando la prueba se realizó por primera vez en la ASMP y posteriormente en la AT ($p < 0.05$, 114 ± 18.15 seg vs. 466 ± 70.55 seg, respectivamente). No se obtuvieron diferencias significativas en el resto de los parámetros evaluados (LM, NM y HR). Por otro lado al comparar a los grupos I y II de la AT, se encontraron una disminución en la LI y la LE, resultados que fueron estadísticamente significativos con una $p < 0.01$ comprobado mediante una U de Mann Whitney en la LI y LE respectivamente.

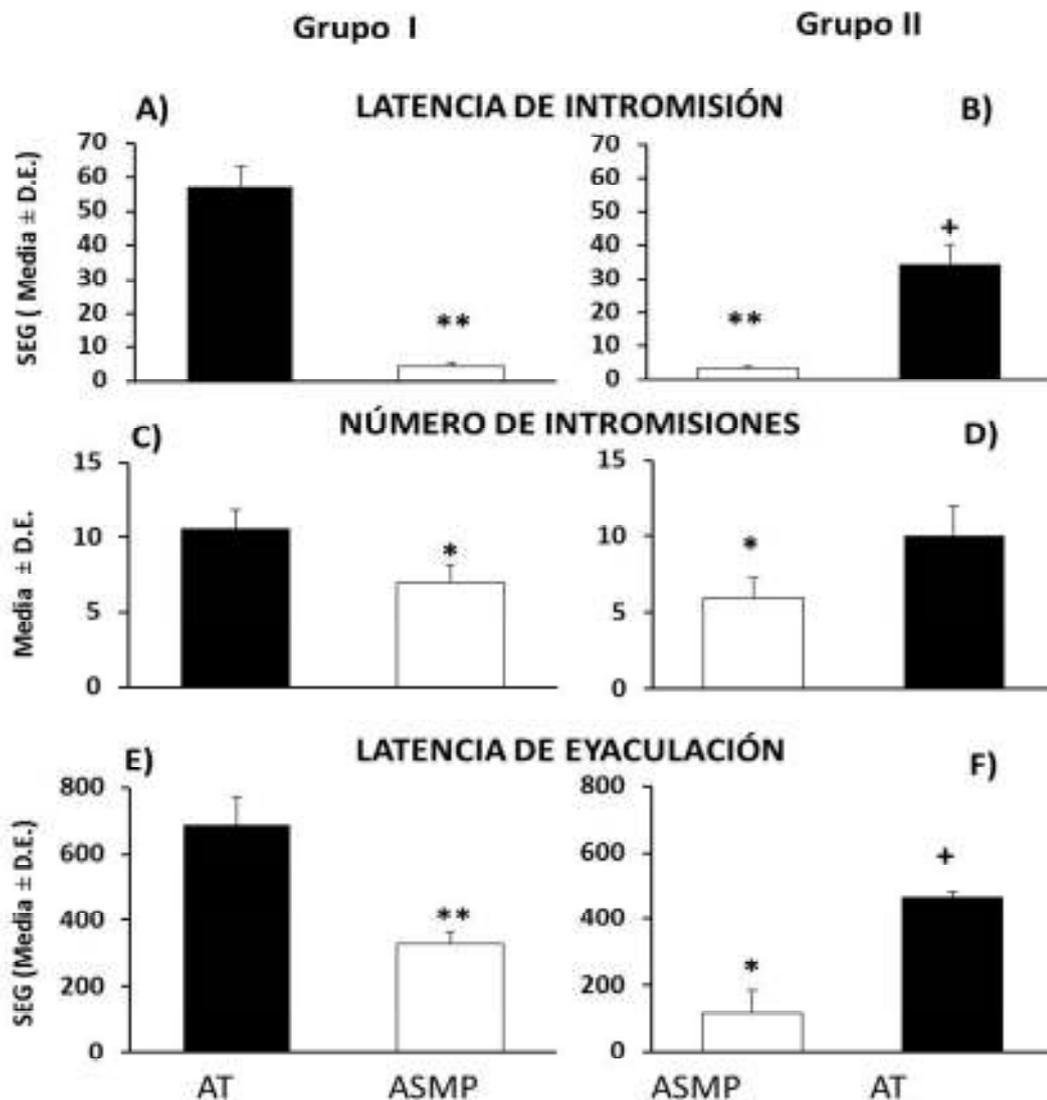


Fig. 9. La media \pm D.E. de la Latencia de Intromisión (A, B), Número de intromisiones (C, D) y la Latencia de eyaculación (E, F) en los dos grupos de ratos machos sexualmente expertos ($n = 10$ por grupo), durante el primera serie copulatoria, después de haber sido probados en dos arenas diferentes: Arena Típica (AT, barras negras) y Arena de Selección Múltiple de Pareja (ASMP, barras blancas) * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$, prueba de Signos de Wilcoxon, + $p < 0.01$ diferente de AT Grupo I después de aplicar prueba de U de Mann Whitney.

15.2. Experimento 2: Validez Teórica.

La Fig. 10 muestra la media \pm D.E. de la LI, LE y NI para los grupos VEH y WAY – 100635 que fueron tratados crónicamente durante 15 días en las dos condiciones experimentales evaluadas (ASMP y AT). Los resultados muestran que los machos del grupo WAY incrementaron progresivamente la LI, LE y NI en ambas arenas durante los días de tratamiento. En la LI después de aplicar una ANOVA de dos vías (arenas vs tratamiento) mostró una interacción significativa entre la arena y el tratamiento en el día 1 [$F(1, 27) = 12,42$], el día 8 [$F(1, 27) = 11,96$], y el día 15 [$F(1, 27) = 11,19$], con una diferencia significativa de $p < 0,003$ en los tres casos (Fig. 10 A). El tratamiento con WAY, produjo un incremento en la LI en los machos que fueron evaluados en la ASMP en comparación a los que fueron evaluados en la AT. Para determinar las diferencias entre los grupos se aplicó una prueba post hoc de Newman Keuls; las comparaciones múltiples por parejas en la LI revelaron que en el primer día de tratamiento, se observó una reducción significativa ($p < 0.05$) en el grupo ASMP - VEH (media \pm D.E. = 3.5 ± 1.13 seg), en comparación con el grupo AT-VEH (11.85 ± 1.46 seg). Posteriormente, en el día 8 de tratamiento, observamos una reducción significativa de la LI ($p < 0.01$) del grupo ASMP-VEH (3 ± 1.52 seg) en comparación con el grupo AT-VEH ($10.14 \pm 1,34$ seg). Finalmente, en el día 15, se observó una reducción significativa de la LI ($p < 0.05$) en el grupo ASMP-VEH (3.5 ± 1.27 seg) en comparación con el grupo AT-VEH ($12.5 \pm 1,90$ seg). También, fue posible observar un aumento gradual de la LI en el curso de tratamiento en el grupo que recibió WAY cuando se evaluó en la ASMP. En el día 8, este aumento fue significativo ($p < 0.05$) en comparación con el grupo de ASMP-VEH (ASMP - WAY, 10.7 ± 2.2 seg vs. ASMP-VEH, 3 ± 1.52 seg). Finalmente, en el día 15 de

tratamiento, se observó un aumento significativo de la LI ($p < 0.01$) del grupo ASMP - WAY (13.74 ± 2.75 seg), en comparación con el grupo de ASMP – VEH (media \pm D.E. = 3.5 ± 1.27). Por otro lado, en el día 8 de la administración se encontró un aumento significativo de la LI ($p < 0.05$) al comparar al grupo WAY-AT (24.7 ± 3.9 seg) en comparación con el grupo VEH-AT (10.14 ± 1.3 seg). En el día 15, al comparar al grupo WAY-AT, se encontró un aumento significativo de la LI ($p < 0.01$) en comparación al grupo VEH-AT (AT-WAY, 30.7 ± 5.2 seg vs AT-VEH, 12.5 ± 1.9 seg).

Para demostrar la relación entre las arenas (AT y ASMP) y los tratamientos (VEH y WAY10635) sobre el parámetro LE, este resultado nos permitirá saber si hay un aumento sobre el tiempo en que eyacule la rata. Por lo tanto al aplicar la ANOVA de dos vías reveló una interacción significativa ($p < 0,03$) entre la arena y el tratamiento en el día 8 [$F(1, 27) = 5,28$]; en el día 15 de igual manera se encontró una interacción con una diferencia significativa de ($p < 0.0001$) [$F(1, 27) = 25,65$] del tratamiento. En este caso particular, los machos del grupo WAY evaluados en la ASMP mostraron un mayor aumento en la LE en comparación a los machos de este mismo grupo evaluados en la AT. Al aplicar la prueba de comparaciones múltiples de Newman–Keuls, se observó en el primer día de tratamiento, una reducción significativa ($p < 0.01$) de la LE en los machos del grupo VEH evaluados en la ASMP (media \pm D.E. = $84.2 \pm 8,8$) en comparación con los machos del grupo VEH evaluados en la AT (205.8 ± 1.3 seg). Posteriormente en el día 8 del tratamiento observamos una reducción significativa de la LE ($p < 0.01$) en los machos del grupo ASMP-VEH (85.1 ± 10.2 seg) comparado con el grupo AT- VEH (209.4 ± 14.6 seg). Por último, en el día 15 del tratamiento se observó un aumento significativo de la LE ($p < 0.01$) en el grupo ASMP–VEH (100.5 ± 12.2 seg) en comparación del grupo AT–VEH ($195.2 \pm$

16.5 seg, ver Fig. 10 B). Por otro lado, en el transcurso del tratamiento con WAY-100635, observamos un aumento gradual de la LE en los machos evaluados en la ASMP en comparación con los machos a los que se les administró el vehículo evaluados en esta misma Arena. En el día 8 de la administración se encontró un aumento significativo de la LE ($p < 0.05$) del grupo ASMP-WAY (146.8 ± 21.6 seg) en comparación con el grupo ASMP-VEH (85.1 ± 10.2 seg), también en día 15 de la administración se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) de la LE en el grupo ASMP-WAY (175.8 ± 14.5 seg) en comparación con el grupo ASMP-VEH (100.5 ± 12.2 seg). En el caso del grupo WAY en la AT se encontró un aumento significativo de la LE ($p < 0.05$) en comparación con el grupo VEH evaluado en la AT, solamente en el día 15 de la administración (AT-WAY, 325.2 ± 8.9 seg vs AT-VEH, 195.2 ± 6.2 seg).

En lo que respecta, al parámetro NI, la ANOVA de dos vías demostró que no existe una interacción entre la arena y el tratamiento. Sin embargo, en este parámetro, los machos tratados con el vehículo y que fueron evaluados en la ASMP mostraron una disminución significativa de este parámetro ($p < 0.05$) en el día 1 del tratamiento (6.3 ± 1.11) en comparación con los machos de este mismo grupo, pero que fueron evaluados en la AT (10 ± 2.69), en día 8 se observó una reducción significativa ($p < 0.05$) del NI en el grupo ASMP-VEH (6.4 ± 0.97) en comparación con el grupo AT-VEH (10.9 ± 2.19), finalmente en el día 15 del tratamiento se observó una reducción significativa del NI en el grupo vehículo evaluado en la ASMP en comparación con el grupo vehículo evaluado en la AT (ASMP - VEH, 6.3 ± 1.11 vs AT - VEH, 10.6 ± 1.39 ; ver Fig. 10 C).

En los machos que fueron tratados con el WAY-10035 durante 15 días continuos y que fueron evaluados en la ASMP se observó un aumento significativo del NI ($p < 0.05$) en el día 8 (ASMP-WAY, 11.3 ± 1.70) en comparación con los machos evaluados en la ASMP y que fueron tratados con el vehículo (ASMP – VEH, 6.4 ± 0.97) y en el día 15 se observó una disminución significativa de este parámetro ($p < 0,01$) en el grupo ASMP–WAY (12.4 ± 2.5) comparado con el grupo ASMP-VEH (6.3 ± 1.11). Finalmente, en el grupo de machos a los que se les administró el WAY-100635 y que fueron evaluados en la AT también se obtuvo un aumento significativo ($p < 0.05$) del NI en comparación con el grupo vehículo y evaluados en la AT (AT - WAY, 14.6 ± 0.81 vs AT - VEH, 10.6 ± 0.52 ; Fig. 10 C).

En los parámetros LM, NM y HR no se obtuvieron diferencias significativas, por lo tanto no se presentan los promedios ni las gráficas.

Es importante señalar que en los tres parámetros mencionados (NI, LI y LE) el grupo de machos a los que se les administró el WAY-100635 y que fueron evaluados en la ASMP, en el día 15 de la administración, mostraron valores muy similares a los que mostraron los machos del grupo vehículo, evaluado en la AT durante la administración del tratamiento; de tal forma que las ratas macho dejan de comportarse como eyaculadores rápidos en la ASMP.

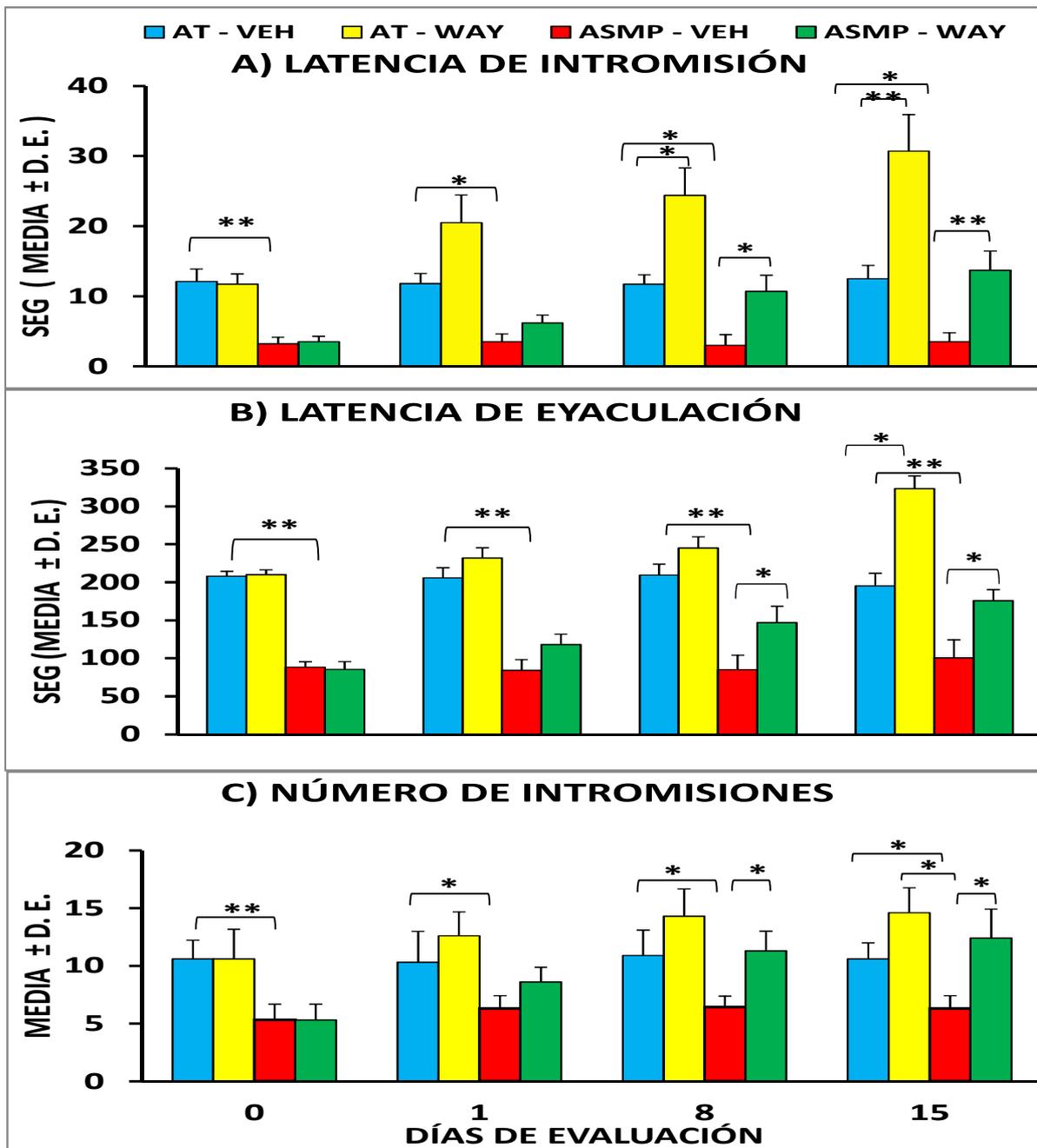


Fig. 10. Efecto de WAY-100635 (WAY) y el vehículo (VEH) después del tratamiento crónico (1, 8 y 15 días) sobre la latencia de intromisión (A), la latencia de eyaculación (B) y el Número de intromisiones (C) de los machos sexualmente expertos (n = 7 por grupo), resultados obtenidos durante la primera serie copulatoria, una vez que fueron probados en la arena típica (AT) o en la arena de selección múltiple de pareja (ASMP). * p < 0.05; ** p < 0.01, ANOVA de dos vías, seguido de una prueba post-hoc de Newman Keuls.

15.3. Experimento 3. Validez Predictiva.

En la Fig. 11 se muestran los resultados del efecto que tuvo la administración aguda de Dapoxetina; los resultados son expresados en medias \pm D.E, sobre los siguientes parámetros de la conducta sexual masculina de la rata macho: NM, NI, LI, LE. En el caso de la tasa de aciertos, no se observaron diferencias significativas en este parámetro y por lo tanto no se muestran los resultados. La administración de Dapoxetina produjo un incremento significativo, en la conducta sexual del macho independientemente de si se administró en la primera o en la segunda prueba.

Por ejemplo, en el NM (Fig. 11 A), la prueba de U de Mann Whitney mostró un aumento significativo ($p < 0.05$) del grupo al que se le administró Dapoxetina en la primera evaluación (medias \pm D.E = 6.4 ± 1.13) en comparación con el grupo vehículo (2.4 ± 0.98). En la segunda evaluación al invertir los tratamientos, los machos que recibieron Dapoxetina en esta evaluación (6.7 ± 1.49) mostraron un aumento significativo ($p < 0.05$) del NM en comparación del grupo al que se les administró el vehículo (2.5 ± 0.98).

En lo que se refiere al NI (Fig. 11 B) se observó un incremento significativo ($p < 0.01$) en el grupo Dapoxetina en la primer evaluación (7.8 ± 1.46) en comparación del grupo vehículo (3.5 ± 0.78). En la segunda evaluación, el grupo que recibió el tratamiento con Dapoxetina, incremento significativamente ($p < 0.01$) el NI (8.5 ± 2.2) en comparación con el grupo vehículo (3.1 ± 1.2).

La prueba de U de Mann Whitney demostró, que en la LI (Fig. 11 C) también observamos un aumento significativo ($p < 0.01$) de este parámetro en los machos a los que se les administró Dapoxetina en la primer evaluación (11.7 ± 1.79 seg) en comparación con

los machos a los que se les administró el vehículo (3.2 ± 0.75 seg). En la segunda evaluación cuando se invirtieron los tratamientos, observamos el mismo efecto en el que se incrementó significativamente la LI ($p < 0.01$), en el grupo al que se le administró Dapoxetina (12.4 ± 1.71 seg) comparado con el grupo vehículo (2.8 ± 1.21 seg).

Por último en la LE (Fig. 11 D) observamos un aumento significativo de este parámetro ($p < 0.01$) en el grupo que fue tratado con Dapoxetina en la primera evaluación (250.2 ± 17.3 seg) en comparación con el grupo vehículo (90.4 ± 12.1 seg). En la segunda evaluación observamos un aumento significativo de la LE ($p < 0.01$) en el grupo tratado con Dapoxetina (260.14 ± 26.9 seg) en comparación con el grupo que fue tratado con el vehículo en la segunda evaluación (85.2 ± 12.8 seg).

En resumen la administración aguda de Dapoxetina incrementó significativamente los parámetros: NM, NI, LI y LE con excepción del HR en la ratas machos que fueron evaluados en la ASMP. Cabe resaltar que al analizar el efecto entre los dos grupos de ratas a los que se les administró Dapoxetina en las dos pruebas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

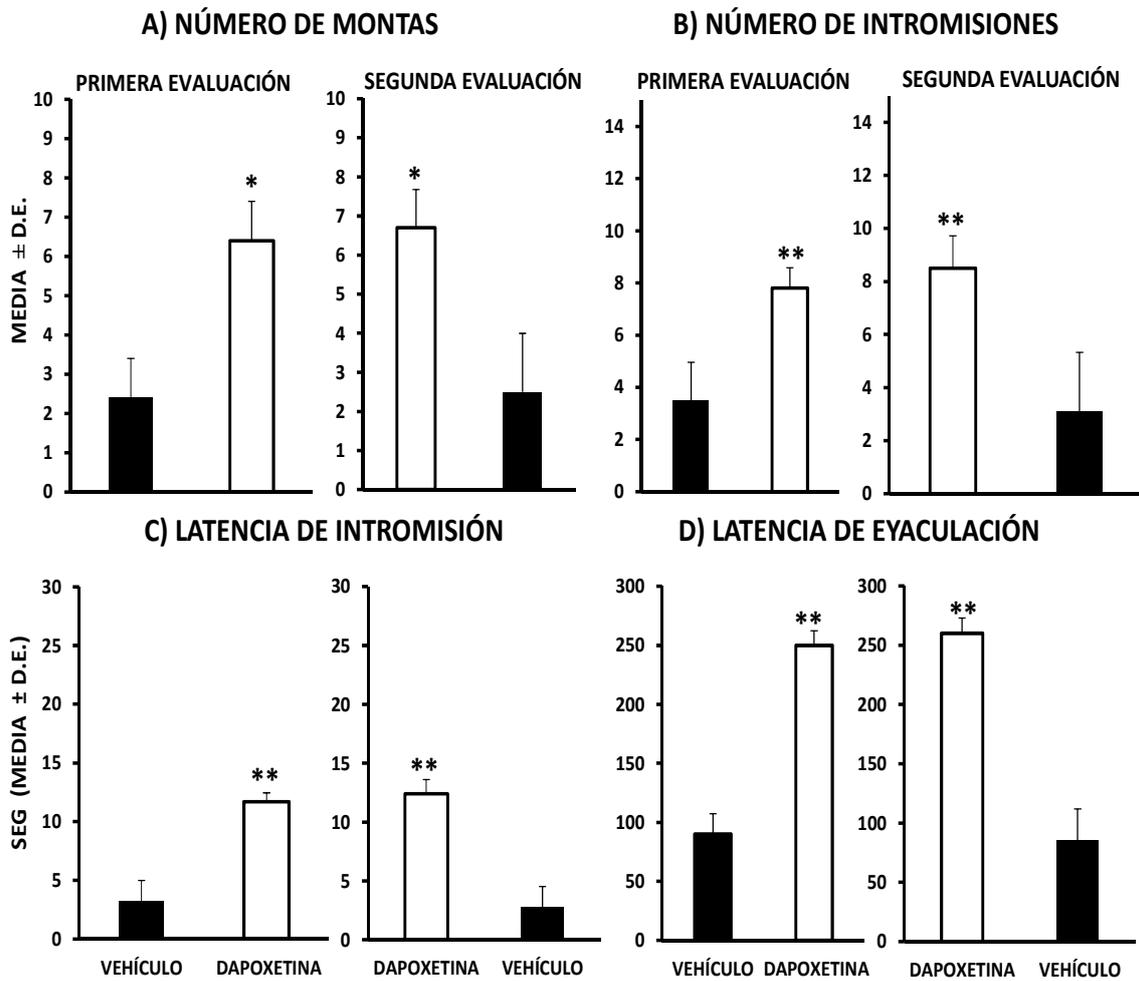


Fig. 11. Efecto de la administración aguda de Dapoxetina y del Vehículo en A) Número de Montas, B) Número de intromisiones, C) Latencia de intromisión, D) Latencia de Eyacuación de dos grupos de ratas machos adultos evaluados en dos sesiones en la Arena de Selección Múltiple de Pareja (ASMP) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, después de aplicar prueba de U de Mann Whitney.

16. DISCUSIÓN

16.1. Experimento 1: Validez de Apariencia.

En este estudio, nos propusimos analizar si la ASMP, cumplía con los criterios de Validez de Apariencia, Validez Teórica y Validez Predictiva propuestas por Willner en 1984, con el fin de determinar si esta arena puede ser un modelo animal potencial para evaluar la EP (Willner, 1984). En el primer experimento, que tuvo por objeto demostrar la Validez de Apariencia, evaluamos si las ratas macho cuando se evalúa su conducta sexual en la ASMP, eyaculan más rápidamente que en una AT. En efecto, en este experimento demostramos que cuando las ratas macho copulan en la ASMP, muestran signos similares a los que presenta EP en el humano, al mostrar una reducción significativa en LE y NI, así como una reducción en la LI, (parámetro que no está considerado como un signo de EP), en comparación a la mostrada por los machos cuando copulan en una AT, independientemente del orden en el que los machos son probados en las dos arenas. La posible respuesta fisiológica que se observa en nuestra ASMP es que debido a la competencia que se establece por copular con la hembra, genera en los machos estrés, de tal forma que en respuesta a ese estrés, los machos reducen significativamente los parámetros de CSM observados: LM, LI, LE. En estudios en los que dos o más ratas macho han sido apareados simultáneamente con una hembra receptiva, con el fin de analizar el efecto que esto tiene sobre la rapidez de la eyaculación, se ha demostrado que los estímulos táctiles pueden inducir estrés, tal es el caso de las descargas eléctricas en las patas o los pellizcos en la cola, los cuales son capaces de estimular la eyaculación en la rata macho (Olivier y cols. 2006; Ferreira Nuño y cols. 2010; Barfield & Sachs 1968; Caggiula & Vlahoulis 1974; Sachs & Barfield 1974). De tal

forma que en la ASMP, debido al estrés que se presenta por la competencia, además de la poca disponibilidad que tiene cada macho con la hembra, esto produce que los machos eyaculen más rápido en la ASMP.

Además, pudimos confirmar que los machos se comportan como eyaculadores rápidos en la ASMP, independientemente del orden en el que se registren las arenas, la experiencia previa no influyó de manera importante en la rapidez con que eyacularon en la siguiente arena, Sin embargo, la reducción observada en la LE en la ASMP, fue más significativa cuando los machos fueron evaluados primero en la AT y posteriormente en la ASMP ($p < 0,01$). (Figuras 9 E y F), en comparación con aquellos que cuando se invirtió el orden en que fueron probados ($p < 0,05$). En estudios realizados por Gordon en 1964, demostró que al separar a un macho de la hembra por durante el coito después de la primera y cuarta intromisión de la primer serie copulatoria, en múltiples intervalos de 5 minutos de duración. Los machos redujeron significativamente la latencia de intromisión, y la latencia de eyaculación a lo que llamo intervalos forzados (Gordon, 1964). En las condiciones de la ASMP, la hembra regula la copula, por lo que también puede regular la permanencia y la frecuencia con la que copula con el macho, lo que podría provocar que los machos detecten la poca disponibilidad que tienen de la hembra y por lo tanto reducen la LI y la LE en estas condiciones.

Waldinger ha sugerido que la ansiedad en el humano puede ser uno de los factores etiológicos de la EP (Waldinger y cols. 2005). Desde hace 25 años se han estudiado los efectos del receptor 5HT_{1A} en la ansiedad y el estrés, además de los antagonistas parciales de este receptor, el antagonista del receptor D₂ la bupiriona, es el único ansiolítico no

selectivo que también tiene efectos sobre el receptor 5HT_{1A} (Olivier, 2014). No obstante, aun cuando todavía no existe un ansiolítico eficaz que actúe modulando al receptor 5HT_{1A}, las evidencias científicas en estudios preclínicos y clínicos, que demuestran la implicación de este receptor en la ansiedad son numerosas (Akimova y cols. 2009; Altieri y cols.2013; Savitz, Lucki, & Drevets, 2009; García García, Newman Tancredi & Leonardo, 2014). Se ha demostrado que el receptor 5HT_{1A} tiene un papel importante en la modulación de los procesos emocionales (Altieri y cols.2013), por otra parte estos estudios demuestran que el mal funcionamiento de este receptor produce vulnerabilidad a las psicopatologías, (García García, Newman Tancredi & Leonardo, 2014; Olivier, 2014. Esto pudiera ser una sugerencia de explicación de nuestros resultados, ya que debido al estrés que se establece en los machos cuando se evalúan en la ASMP, esto probablemente ocasionó un mal funcionamiento del receptor 5HT_{1A} presináptico y como consecuencia se produce poca liberación de serotonina, provocando que las ratas eyaculen más rápido en la ASMP.

Por otro lado, es importante mencionar que, aunque nuestros datos sugieren que la ASMP cumple con la Validez de Apariencia, como modelo animal potencial para el estudio de la EP y que este trastorno sexual en los seres humanos, puede ser causada por el estrés o la ansiedad, la ASMP no satisface los criterios de fiabilidad ó replicabilidad propuestos por (van der Staay 2006; van der Staay, Arndt & Nordquist 2009b); es decir que la EP en el humano, al menos hasta el momento no se ha demostrado que se genere por la competencia que se establece entre varios hombres por copular con una mujer; sin embargo y como se demostró en este estudio la eyaculación rápida exhibida por las ratas macho en la ASMP puede estar causada por el estrés que les genera la competencia.

En conclusión en este experimento, pudimos demostrar que debido a las condiciones experimentales impuestas por la ASMP, las ratas macho eyaculan más rápido en esta arena, que cuando son probadas en una AT. Por otro lado, nuestro modelo puede ser más representativo de la EP adquirida en humanos la cual se caracteriza por que los hombres eyaculan rápidamente por alguna situación (endógena o exógena) y que esta desaparece cuando las condiciones cambian a diferencia del tipo de EP que se produce en cualquier situación de la vida sexual (McMahon y cols. 2011).

16.2. Experimento 2: Validez Teórica.

El segundo experimento de este estudio se realizó para determinar si la ASMP cumplía con la Validez Teórica, demostrando que los receptores $5HT_{1A}$ están implicados en la eyaculación rápida que muestra la rata macho cuando es evaluada en la ASMP. En caso de ser cierto esto, entonces esta respuesta podría ser modificada mediante la administración del antagonista de los receptores $5HT_{1A}$, el **WAY-100635**. En este experimento, los valores obtenidos por los grupos que fueron tratados solamente con el vehículo (AT-VEH y ASMP-VEH), en los tres parámetros (LI, LE y NI), permanecieron prácticamente constantes, durante los 15 días de tratamiento. En cambio, tal y como esperábamos, los machos que fueron tratados diariamente con este fármaco y evaluados en la ASMP (ASMP-WAY), fueron corrigiendo paulatinamente la eyaculación rápida mostrada, hasta obtener en el día 15, resultados similares a los que mostraron las ratas macho que fueron evaluadas en la AT y tratadas sólo con el vehículo (AT-VEH). Al día 15: la LI, LE, y el NI aumentaron en el grupo tratado con WAY en la ASMP con respecto a los parámetros observados en esta arena cuando fueron tratados con el vehículo (Fig. 10 A, B y C). De tal modo que al

administrar WAY-10635 un antagonista selectivo del receptor $5HT_{1A}$ (Forster y cols. 1995), a ratas macho sexualmente expertas que se comportaron como eyaculadores rápidos y que fueron evaluadas en la ASMP, actúa bloqueando al receptor y aumentando la liberación de serotonina al espacio sináptico, dando como resultado que la eyaculación se retarde y que los parámetros (LI, NI y LE) aumenten significativamente.

En el caso de los grupos tratados con WAY-100635 y evaluados en ambas arenas (grupos AT-WAY y ASMP-WAY), a pesar de que se observó un aumento similar en los tres parámetros a lo largo del tratamiento, encontramos un mayor efecto del WAY-100635 en la ASMP en la LE y el NI. Como se mencionó anteriormente, se ha demostrado la participación del receptor $5HT_{1A}$ en psicopatologías (García García, Newman Tancredi & Leonardo, 2014; Olivier, 2014) de tal forma que por la condición de estrés que presentan las ratas en la ASMP, esta podría estar alterando la función del receptor $5HT_{1A}$, como lo propuso Waldinger en su teoría de la EP (Ahlenius y cols. 1981; Waldinger y cols. 1998; Waldinger, 2002; Pattij, Waldinger & Olivier, 2005; de Jong y cols. 2005; Mcarty & Dinsmore 2012). Una posible explicación de nuestros resultados es que con la administración del WAY-100635, este fármaco bloquea gradualmente al receptor $5HT_{1A}$ a lo largo de los 15 días del tratamiento y produciendo un aumento en la liberación de serotonina a nivel sináptico, lo que se refleja en el incremento gradual de los parámetros NI, LI y LE, pero para poder corroborar esta hipótesis es necesario medir la concentración de serotonina liberada en experimentos posteriores en la ASMP. Hasta la fecha, los estudios clínicos en los que se ha empleado un antagonista del receptor $5HT_{1A}$ en el tratamiento de la EP son muy escasos. De hecho, sólo hay un estudio en el que se co-administró de manera diaria 7.5 mg de pindolol (un antagonista parcial de los receptores de β -adrenoceptor/5-

HT_{1A}) y 20 mg del ISRS paroxetina, en hombres con EP, obteniendo resultados satisfactorios en el tratamiento de esta disfunción sexual (aumentó 3.9 veces la latencia de eyaculación intravaginal, Safarinejad, 2008). Sin embargo, en ese estudio el tratamiento sólo resultó mejor que el placebo en los pacientes refractarios a la paroxetina, por lo que es necesario realizar más investigaciones clínicas con antagonistas de receptor 5HT_{1A} para documentar que este tratamiento de la EP podría tener resultados positivos. De tal modo, que entre más modelos animales existan actualmente donde se evalúe el efecto de antagonistas del receptor 5HT_{1A} como el WAY-100635 y su efecto sobre la eyaculación rápida en la rata, proporcionarán más datos para entender los mecanismos fisiológicos de esta disfunción sexual.

Por otro lado, es importante mencionar que en este segundo experimento, los resultados que obtuvimos con WAY-100635 en donde se demuestra que hay una reducción sobre la LI, LE y NI en la ASMP, difieren de los publicados por de Jong y cols. (2005) en donde utilizó las mismas dosis, el mismo esquema de tratamiento (15 días) y el WAY-100635 y ratas de cepa Wistar y no tuvo un efecto significativo en la frecuencia de eyaculación, mientras que observó un efecto variable sobre la LI, LE y frecuencia de intromisión de las ratas machos evaluadas en una AT. En contraste, en nuestro experimento observamos en la ASMP un efecto significativo de este fármaco en todos los parámetros evaluados de la CSM (NI, LI y LE; Fig. 10 A, B y C). Existen varias explicaciones de las diferencias entre los resultados, ya que el trabajo de Jong (2005), se realizó en Holanda y este estudio en la Cd. de México (2010-2014), se utilizó a la misma de cepa de ratas Wistar, pero las condiciones de laboratorio y la genética de las ratas fueron diferentes. Además, las condiciones impuestas por la ASMP sobre el comportamiento sexual de la rata macho, son

diferentes de los de la AT, debido a que el factor de estrés sólo está presente en la ASMP. Esta condición es probable que este cambiando la expresión de los sistemas neurotransmisión implicados en la eyaculación. La activación selectiva del receptor 5HT_{1A} tiene efecto sobre el umbral eyaculatorio, en el primer reporte científico en el que se administró un agonista del receptor 5HT_{1A}, el 8-OH-DPAT, mostró que se redujeron significativamente la frecuencia de intromisión, y la latencia de eyaculación (Ahlenius y cols. 1981) y que estos efectos pueden ser revertidos mediante la administración de antagonistas del receptor 5HT_{1A} (Ahlenius & Larsson, 1998; Hillegaart & Ahlenius, 1998) indicando que la activación del receptor 5HT_{1A} esta implicado en la reducción del umbral eyaculatorio, como ya se mencionó anteriormente, es posible que las condiciones de la ASMP provoquen una alteración en el receptor 5HT_{1A} debido al estrés que les genera la competencia por copular con la hembra, reduciendo el umbral eyaculatorio de estas ratas, por lo que esto podría determinar que tengamos un mayor efecto del WAY-100635 en la ASMP que en la AT, a diferencia de los resultados que obtuvo de Jong y cols. (2005). Adicionalmente, experimentos farmacológicos recientes, sugieren que diferentes subtipos del receptor 5HT_{1A} regulan diferentes aspectos en la conducta sexual masculina de la rata macho (Hsieh y cols. 2011; de Jong & Neumann, 2015), Sin embargo, es necesario hacer más investigaciones científicas que involucren estudios en diferentes animales, cepas, edades y distintos tratamientos (dosis y días) para corroborar estas hipótesis. Por lo que nuestro modelo podría ser útil para comprobar la participación del receptor 5HT_{1A} en la eyaculación rápida de la rata y para desarrollar fármacos que puedan modular el funcionamiento de este receptor.

Por último, una de las ventajas que tiene la ASMP, con respecto a otros modelos animales, es que las ratas machos se comportan de forma espontánea como eyaculadores "rápidos", sin tener que administrar fármacos inductores de la eyaculación como el 8-OH DPAT. Otra ventaja es que el 100 % de los machos evaluados en la ASMP, tienen patrones similares a los encontrados en los seres humanos que presentan EP, mientras que con otros modelos animales, se ha demostrado que el porcentaje de sujetos evaluados en una AT que presenta este fenómeno es del 10 % aproximadamente (Waldinger 2005; Olivier y cols. 2006; Pattij, Olivier & Waldinger, 2005).

16.3. Experimento 3: Validez Predictiva.

En el tercer experimento de este estudio analizamos si la ASMP cumple el criterio de Validez Predictiva propuesto por Willner (1984). Este criterio postula que el modelo animal propuesto, debe responder a los fármacos que han demostrado clínicamente su eficacia en el tratamiento del trastorno a estudiar. En este sentido, para que la ASMP pudiera cumplir con el criterio de Validez Predictiva, como modelo experimental para la evaluación de la EP, las ratas macho tendrían que corregir la eyaculación rápida que presentan en esta arena, mediante la administración de un ISRS, ya que son los fármacos más empleados en el tratamiento de la EP. En el caso particular de este estudio utilizamos a la Dapoxetina, que es el ISRS que actualmente se prescribe para el tratamiento de la EP, por ser el más eficaz para corregir este trastorno sexual (Waldinger, Scheitzer & Olivier, 2006; McMahon y cols. 2011). De acuerdo con nuestros resultados, los dos grupos de machos a los que se le administró Dapoxetina, en una dosis de 30 mg/kg aumentaron significativamente y de manera semejante el NM y NI que requirieron para eyacular con

respecto al grupo control, al igual que la LI y la LE a niveles semejantes a los que presentan los machos en la primera serie eyaculatoria cuando son probados en una AT (Fernández Guasti y Rodríguez Manzo 2003; Ferreira Nuño y cols. 2005; 2010 y Olayo Lortia y cols. 2014). Por tanto, estos resultados demuestran que la Dapoxetina fue capaz de corregir la eyaculación rápida que presenta la rata macho en la ASMP, de manera semejante a como este fármaco ejerce su acción en la EP del humano (Waldinger, Scheitzer & Olivier, 2006; McMahon, 2010, 2012; Feige, Pinsky & Hellstrom, 2011), es decir, que actúan bloqueando al transportador de serotonina de tal manera que aumenta la cantidad de serotonina disponible en el espacio sináptico (Waldinger y cols 1998). Lo que nos permitió comprobar que la ASMP cumple con el criterio de Validez Predictiva propuesta por Willner (Willner, 1984, van der Staay y cols. 2009a).

Sin embargo, aunque en general nuestros resultados concuerdan con uno de los escasos reportes que existen del efecto de la Dapoxetina sobre la conducta sexual masculina de ratas macho adultas, realizado por Clément y cols. 2012, existen algunas diferencias relevantes de ser comentadas. Por ejemplo, en el estudio de Clément y cols. 2012, administraron oralmente una dosis de Dapoxetina de 300 mg/kg (disuelta en una solución acuosa de metilcelulosa al 0.6%), tres horas antes de la prueba sexual, a ratas macho que fueron clasificadas previamente como lentas, medias o rápidas, en relación con su rapidez de eyaculación, antes de ser probadas en una arena rectangular típica, durante 30 minutos. En este estudio, la Dapoxetina logró incrementar significativamente el promedio de la latencia de eyaculación de la primera serie eyaculatoria y disminuir significativamente la frecuencia eyaculatoria, solamente en las ratas rápidas. En cambio en nuestro estudio y basándonos en los estudios clínicos de McMahon y cols. (2012), empleamos una dosis 10

veces menor de Dapoxetina (30 mg/kg), la cual fue administrada por vía oral una hora antes del experimento, logrando incrementar significativamente varios parámetros de la conducta sexual (latencia de intromisión, latencia de eyaculación y número de montas e intromisiones que preceden a la primera eyaculación). Dado que en nuestros experimentos solamente analizamos la primera serie eyaculatoria, no pudimos observar una reducción en la frecuencia eyaculatoria, como fue el caso de Clément y cols. 2012. Sin embargo, la dosis de Dapoxetina que administramos, la cual es la misma que se emplea en el tratamiento de la EP en humanos, tuvo efectos sobre los diferentes parámetros de la CSM, al aumentar la LI y LE, sin embargo hay que mencionar que fue mucho menor a la empleada por Clément y cols. en el 2012. Es posible que las diferencias encontradas en ambos estudios, se deban a las diferentes dosis empleadas, a diferentes factores exógenos, como son el esquema en que se administró la Dapoxetina (3 h vs. 1 h), las diferentes arenas en que las que se evaluó la conducta sexual (rectangular típica vs. ASMP) y a que nosotros empleamos machos sexualmente expertos, que eyacularon por lo menos 2 veces en 15 min, mientras que Clément y cols. utilizaron tres tipos diferentes de ratas (*lentos, normales y rápidos*) y sólo encontraron un efecto significativo con la Dapoxetina sobre el aumento en la LE, LI y frecuencia de intromisión de las ratas *eyaculadores rápidos*.

Mediante la administración aguda y crónica de ISRS se ha analizado la participación del receptor 5HT_{2C} en la eyaculación de la rata y del humano (Giuliano 2007; Giuliano y cols. 2007) así como las implicaciones que tiene la reducción en la neurotransmisión de la serotonina y/o el mal funcionamiento de sus receptores, en la patofisiología de la EP (Waldinger, 2002). En este aspecto, se ha propuesto que los ISRS son capaces de retrasar la eyaculación, inhibiendo al transportador de serotonina y a su vez elevando la cantidad de

serotonina disponible (Giuliano, 2007). No obstante, el mecanismo de acción por el cual actúan estos fármacos todavía no está claro debido a la variabilidad de los resultados obtenidos con diferentes ISRS (Olivier y cols. 2011; Morales, 2012; McMahon, 2010, 2012; Olivier, 2014). Esta variabilidad podría deberse a que en estos estudios se han utilizado diferentes cepas de ratas, con diferencias en su desempeño y experiencia sexual previa (Mos y cols. 1999; de Jong y cols. 2006; Clément y cols. 2012). Actualmente, la Dapoxetina es uno de los ISRS más empleado en el tratamiento de la EP, debido a que tiene una vida media muy corta, alcanza su pico máximo en el plasma sanguíneo en poco tiempo (aproximadamente 60 minutos), logrando retrasar la latencia de eyaculación intravaginal, por lo que no requiere de una administración crónica para tener efecto sobre la eyaculación en el caso de los humanos (Waldinger, Scheitzer & Olivier, 2006; McMahon, 2010, 2012; Guiliano y Clément, 2012; Pryor y cols. 2006, Buvat y cols. 2009; Porst y cols. 2010; McMahon y cols. 2011).

17. CONCLUSIÓN

Hasta ahora hemos podido demostrar en estudios anteriores (Ferreira Nuño y cols. 2010; Olayo Lortia y cols. 2014), a) que la ASMP cumple con los criterios de validación de Willner para modelos animales ya que reproduce los síntomas de la EP tal cual se presenta en el humano (Validez de Apariencia), b) que la ASMP satisface la Validez Teórica parcialmente, en la medida que pudimos demostrar que la eyaculación rápida que presentan los machos en la ASMP, parece estar causada por una hipersensibilidad de los receptores 5HT_{1A}, lo que concuerda con la actual teoría de la EP propuesta por Waldinger

en 1998, sin embargo hasta el momento no se ha identificado la participación de este receptor en humanos debido a que los fármacos que son utilizados para determinarlo todavía no son totalmente aprobados por el FDA para el tratamiento clínico de esta disfunción en el humano. Por último, en el presente estudio pudimos demostrar que la ASMP también satisface el criterio de Validez Predictiva, ya que las ratas macho en la ASMP respondieron al tratamiento farmacológico del ISRS (Dapoxetina), que actualmente se utiliza en la clínica en el tratamiento de la EP. Por tal motivo, consideramos que la ASMP es un modelo experimental más completo para evaluar la eyaculación rápida en la rata, situación que es similar a lo que estaría ocurriendo en la EP en el humano, ya que además de satisfacer estos tres criterios, no requieren de fármacos que estimulen la eyaculación y de anestésicos a las ratas experimentales, ni de manipulaciones quirúrgicas como lo necesitan otros modelos (Guiliano y cols. 2007; Clément y cols. 2007; Borgdorff, y cols. 2009; Kang y cols. 2013).

Por lo tanto este estudio resulta muy importante e innovador, debido a que aporta una nueva propuesta de modelo experimental que puede ser utilizado para estudiar la eyaculación rápida en la rata. Además de que este nuevo modelo animal puede contribuir al estudio de fármacos que retarden la eyaculación de tal manera que pueda comprenderse mejor los mecanismos de acción que están involucrados en la eyaculación precoz del humano y así generar opciones terapéuticas más eficaces y que mejoren la calidad de vida de las personas que padecen de este trastorno sexual.

18. PROPUESTAS A FUTURO

Evaluar fármacos como los ISRS y agonistas de los receptores dopaminérgicos de los cuales todavía no está comprendido del todo su mecanismo de acción, que puedan utilizarse en el tratamiento de la EP; utilizando la ASMP. Actualmente el costo y administración de la Dapoxetina es muy caro; por lo tanto se debe de pensar en innovar un fármaco que pueda administrarse a demanda y con una menor dosis. Además la arena de selección múltiple de pareja pueda ser utilizado para probar otros fármacos que puedan tener efecto sobre la eyaculación de tal manera que puedan ser utilizados como opciones terapéuticas más efectivas, con menores efectos secundarios, menos costosos y que mejoren la calidad de vida y salud sexual de los individuos.

19. REFERENCIAS

1. (APA), A. P. (2000). *DSM-IV-TR*. Barcelona: Masson.
2. Agmo, A. (1997). Male rat sexual behavior. *Brain Rec Protoc (1)*, 203-209.
3. Ahlenius, S., Larsson, K., Svensson, L., Hjorth, S., Carlsson, A., Lindberg, P., Wikström, H., Sanchez, D., Arvidsson, L. E., Hacksell, U & Nilsson, J.L. (1981). Effects of a new type of 5-HT receptor agonist on male rat sexual behavior. *Pharmacol Biochem Behav (5)*, 785-792.
4. Ahlenius, S., & Larsson, K. (1995). Effects of the dopamine D3 receptor ligand 7-OH-DPAT on male rat ejaculatory behavior. *Pharmacol Biochem Behav (2-3)*, 545-547.
5. Ahlenius, S., & Larsson, K. (1998). Evidence for an involvement of 5-HT1B receptors in the inhibition of male rat ejaculatory behavior produced by 5-HTP. *Psychopharmacology (Berl) (4)*, 374-382.
6. Akaoka, H., Charléty, P., Saunier, C. F., Buda, M., & Chouvet, G. (1992). Inhibition of nigral dopamine neurons by systemic and local apomorphine: possible contribution of dendritic autoreceptors. *Neuroscience (4)*, 879-891.
7. Akimova, E. L., Lanzenberger, R. & Kasper, S. (2009). The serotonin-1A receptor in anxiety disorders. *Biol Psychiatry, 66*, 627 - 635.
8. Akiskal, H. S. (1980). External validating criteria for psychiatric diagnosis: their application in affective disorders. *J Clin Psychiatry (12 Pt 2)*, 6-15.
9. Allard, J., Truitt, W. A., McKenna, K. E., & Coolen, L. M. (2005). Spinal cord control of ejaculation. *World J Urol (2)*, 119 - 126.
10. Altieri, S. Garcia-Garcia, A. L., Leonardo, E.D., & Andrews, A.M. (2013). Rethinking 5-HT1A Receptors: Emerging Modes of Inhibitory Feedback of Relevance to Emotion-Related Behavior. *ACS Chem Neurosci (4)*, 72 - 83.
11. Amelar, R. D., & Hotckis, R. S. (1965). The split ejaculate: Its use in the management of male infertility. *Fertil Steril (16)*, 46 - 60.
12. Aznar, S., Qian, Z., Shah, R., Rahbek, B., & Knudsen, G. M. (2003). The 5-HT1A serotonin receptor is located on calbindin- and parvalbumin-containing neurons in the rat brain. *Brain Res (1)*, 58-67.
13. Barfield, R. J., & Sachs, B. D. (1968). Sexual behaviour: stimulation by painful electrical shock to skin in male rats. *Science (3839)*, 392-393.
14. Beach, F. (1947). Hormones and mating behavior in vertebrates. *Recent Prog Horm Res (1)*, 27 - 63.
15. Biering-Sørensen, F., Laeessøe, L., Sønksen, J., Bagi, P., Nielsen, J. B., & Kristensen, J. K. (2005). The effect of penile vibratory stimulation on male fertility potential, spasticity and neurogenic detrusor overactivity in spinal cord lesioned individuals. *Acta Neurochir Suppl (93)*, 159 -163.
16. Bitran, D., Thompson, J. T., Hull, E. M., & Sachs, B. D. (1989). Quinelorane (LY163502), a D2 dopamine receptor agonist, facilitates seminal emission, but inhibits penile erection in the rat. *Pharmacol Biochem Behav (3)*, 453-458.
17. Borgdorff, A. J., Rössler, A. S., Clément, P., Bernabé, J., Alexandre, L., & Giuliano, F. (2009). Differences in the spinal command of ejaculation in rapid ejaculating rats. *J Sex Med (8)*, 2197-2205.

18. Bouthenet, M. L., Souil, E., Martres, M. P., Sokoloff, P., Giros, B., & Schwartz, J. C. (1991). Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brain Res* (2), 203-219.
19. Brackett, N. L., Ferrell, S. M., Aballa, T. C., Amador, M. J., Padron, O. F., Sonksen, J., & Lynne, C. M. (1998). An analysis of 653 trials of penile vibratory stimulation in men with spinal cord injury. *J Urol* (159), 1931-1934.
20. Buvat, J., Tesfaye, F., Rothman, M., Rivas, D. A., & Giuliano, F. (2009). Dapoxetine for the treatment of premature ejaculation: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial in 22 countries. *Eur Urol* (4), 957-967.
21. Caggiula, A., & Vlahoulis, M. (1974). Modifications in the copulatory performance of male rats produced by repeated peripheral shock. *Behav Biol* (11), 269-274.
22. Ciliax, B. J., Nash, N., Heilman, C., Sunahara, R., Hartney, A., Tiberi, M., Rye, D.B., Caron, M.G., Niznik, H.B., & Levey, A. I. (2000). Dopamine D(5) receptor immunolocalization in rat and monkey brain. *Synapse* (2), 125 - 145.
23. Clément, P., Bernabé, J., Kia, H. K., Alexandre, L., & Giuliano, F. (2006). D2-like receptors mediate the expulsion phase of ejaculation elicited by 8-hydroxy-2-(di-N-propylamino)tetrinalin in rats. *J Pharmacol Exp Ther* (2), 830-834.
24. Clément, P., Bernabé, J., Denys, P., Alexandre, L., & Giuliano, F. (2007). Ejaculation induced by i.c.v. injection of the preferential dopamine D(3) receptor agonist 7-hydroxy-2-(di-N-propylamino)tetrinalin in anesthetized rats. *Neuroscience* (2), 60-610.
25. Clément, P., Laurin, M., Compagnie, S., Facchinetti, P., Bernabé, J., Alexandre, L., & Giuliano, F. (2012). Effect of dapoxetine on ejaculatory performance and related brain neuronal activity in rapid ejaculator rats. *J Sex Med* (9), 2562-2573.
26. Coolen, L. M., Peters, J. P., & Veening, J. G. (1996). Fos immunoreactivity in the rat brain following consummatory elements of sexual behavior: A sex comparison. *Brain Res* (738), 67 - 82.
27. Coolen, L. M., Peters, J. P., & Veening, J. G. (1997). The distribution of Fos-immunoreactivity following mating versus anogenital investigation in the male rat brain. *Neuroscience* (77), 1151 - 1161.
28. Coolen, L. M., & Wood, R. I. (1998). Bidirectional connections of the medial amygdaloid nucleus in the Syrian hamster brain: simultaneous anterograde and retrograde tract tracing. *J Comp Neurol* (2), 189 - 209.
29. Coolen, L. M., Peters, H. J., & Veening, J. G. (1998). Anatomical interrelationship of the medial preoptic area and other brain regions activated following male sexual behavior: A combined fos and tract-tracing study. *J Comp Neurol* (397), 421 - 435.
30. Coolen, L. M., Veening, J. G., Wells, A. B., & Shipley, M. T. (2003). Afferent connections of the parvocellular subparafascicular thalamic nucleus in the rat: evidence for functional subdivisions. *J Comp Neurol* (2), 132 - 156.
31. Coolen, L. M. (2005). Control neural of ejaculation. *J Comp Neurol* (493), 39 - 45.
32. Czyrak, A., Chocyk, A., Maćkowiak, M., Fijał, K., & Wedzony, K. (2000). Distribution of dopamine D1 receptors in the nucleus paraventricularis of the hypothalamus in rats: an immunohistochemical study. *Brain Res Mol Brain Res* (1-2), 209 - 217.
33. De Groat, W. C., & Steers, W. D. (1990). Autonomic regulation of the urinary bladder and sexual organs. En: A. D. Loewy, & K. M. Spyer (Eds.), *Central regulation of autonomic function* (págs. 310 - 333). New York: Oxford University Press.

34. de Jong, T. R., Pattij, T., Veening, J. G., Dederen, P. J., Waldinger, M. D., Cools, A. R., & Olivier, B. (2005). Citalopram combined with WAY 100635 inhibits ejaculation and ejaculation-related Fos immunoreactivity. *J Pharmacol* (509), 49-59.
35. de Jong, T. R., Veening, J. G., Waldinger, M. D., Cools, A. R., & Olivier, B. (2006). Serotonin and the neurobiology of the ejaculatory threshold. *Neurosci Biobehav Rev* (7), 893-907.
36. de Jong, T. R., & Neumann, I. D. (2015). Moderate Role of Oxytocin in the Pro-Ejaculatory Effect of the 5-HT1A Receptor Agonist 8-OH-DPAT. *J Sex Med* (1), 17 - 28.
37. Durán, I., Gil, L., & Cueva-Rolón, R. (2000). Masculine copulatory behavior is facilitated by intrathecally administered muscarine. *Exp Brain Res* (4), 490-496.
38. Feige, A. M., Pinsky, M. R., & Hellstrom, W. J. (2011) Dapoxetine for premature ejaculation. *Clin Pharmacol Ther* (1), 125-128.
39. Fernández Guasti, A., Escalante, A. L., Ahlenius, S., Hillegaart, V., & Larsson, K. (1992). Stimulation of 5-HT1A and 5-HT1B receptors in brain regions and its effects on male rat sexual behaviour. *Eur J Pharmacol* (2), 121-129.
40. Fernández Guasti, A., & Rodríguez Manzo, G. (2003) Pharmacological and physiological aspects of sexual exhaustion in male rats. *Scand J Psychol* (3), 257-263.
41. Ferrari, F., & Giuliani, D. (1996). Behavioral effects induced by the dopamine D3 agonist 7-OH-DPAT in sexually-active and -inactive male rats. *Neuropharmacology* (3), 279-284.
42. Ferreira Nuño, A., Morales Otal, A., Paredes, R. G., & Velázquez Moctezuma, J. (2005). Sexual behavior of female rats in a multiple-partner preference test. *Horm Behav* (3), 290-296.
43. Ferreira Nuño, A., Fernández Soto, C., Olayo Lortia, J., Ramirez Carreto, R., Paredes, R. G., Velázquez Moctezuma, J., & Morales Otal, A. (2010). Copulatory pattern of male rats in a multiple partner choice arena. *J Sex Med* (12), 3845-3856.
44. Filip, M., & Bader, M. (2009). Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. *Pharmacol Rep* (5), 761-777.
45. Forster, E. A., Cliffe, I. A., Bill, D. J., Dover, G. M, Jones, D., Reilly, Y., & Fletcher, A. (1995). A pharmacological profile of the selective silent 5-HT1A receptor antagonist, WAY-100635. *Eur J Pharmacol* (1), 81 – 88.
46. Garcia Garcia, A. Newman Tancredi, A., & Leonardo, E. D. (2014). 5-HT(1A) [corrected] receptors in mood and anxiety: recent insights into autoreceptor versus heteroreceptor function. *Psychopharmacology (Berl)* (4), 623 - 636.
47. Gerstenberg, T. C., Levin, R. J., & Wagner, G. (1990). Erection and ejaculation in man. Assessment of the electromyographic activity of the bulbocavernosus and ischiocavernosus muscles. *Br J Urol* (4), 395 - 402.
48. Giuliani, D., Ottani, A., & Ferrari, F. (2002). Influence of sildenafil on copulatory behaviour in sluggish or normal ejaculator male rats: a central dopamine mediated effect? *Neuropharmacology* (4), 562 - 567.
49. Giuliano, F., & Clément, P. (2005). Physiology of ejaculation: emphasis on serotonergic control. *Eur Urol* (3), 408 - 417.
50. Giuliano, F. (2007). 5-Hydroxytryptamine in premature ejaculation: opportunities for therapeutic intervention. *Trends Neurosci* (2), 79-84.
51. Giuliano, F., Bernabé, J., Gengo, P., Alexandre, L., & Clément, P. (2007). Effect of acute dapoxetine administration on the pudendal motoneuron reflex in anesthetized rats: comparison with paroxetine. *J Urol* (177), 386-389.

52. Graziottin, A., & Althof, S. (2011). What does premature ejaculation mean to the man, the woman, and the couple? *J Sex Med* (Suppl 4), 304-309.
53. Gordon, B. (1964). Effects of single and multiple enforced intercopulatory intervals on the sexual behavior of male rats. *J Comp Physiol Psychol* (57), 398 – 403.
54. Hillegaart, V., Ahlenius, S., & Larsson, K. (1991). Region-selective inhibition of male rat sexual behavior and motor performance by localized forebrain 5-HT injections: a comparison with effects produced by 8-OH-DPAT. *Behav Brain Res* (2), 169-180.
55. Hillegaart, V., & Ahlenius, S. (1998). Facilitation and inhibition of male rat ejaculatory behaviour by the respective 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor agonists 8-OH-DPAT and anpirtoline, as evidenced by use of the corresponding new and selective receptor antagonists NAD-299 and NAS-181. *Br J Pharmacol* (8), 1733-1743.
56. Hilnak, Z. (1986). Precopulatory behavior of laboratory rat: an ethological approach. *Activ. Nerv. Sup* (28), 108-116.
57. Hitchcott, P. K., Bonardi, C. M., & Phillips, G. D. (1997). Enhanced stimulus-reward learning by intra-amygdala administration of a D3 dopamine receptor agonist. *Psychopharmacology (Berl)* (3), 240-248.
58. Hsieh, J. T., Liu, S. P., Chang, H. C., Tsai, V. F., Chien, C. T., Yu, H. J., & Ho, C. H. (2011). The Activation of Peripheral 5-HT_{1A} Receptors Can Inhibit Seminal Vesicle Contraction: An In Vivo Animal Study. *Urology* (2), 376-379.
59. Hull, E. M., & Dominguez, J. (2007). Sexual behavior in male rodents. *Horm Behav* (1), 45-55.
60. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. (2010). *Censo Nacional de jPoblación*. México.
61. Kang, K. K., Ahn, G. J., Sung, J. H., Kim, S. H., Kim, H., & Lee, S. (2013). Ejaculatory responses are inhibited by a new chemical entity, DA-8031, in preclinical rodent models of ejaculation. *Urology* (4), 920.e13-8.
62. Keast, J. R. (1995). Visualization and immunohistochemical characterization of sympathetic and parasympathetic neurons in the male rat major pelvic ganglion. *Neuroscience* (3), 655 - 662.
63. Klint, T., & Larsson, K. (1995). Clozapine acts as a 5-HT₂ antagonist by attenuating DOI-induced inhibition of male rat sexual behaviour. *Psychopharmacology (Berl)* (3), 291-294.
64. Kudwa, A. E., Dominguez Salazar, E., Cabrera, D. M., Sibley, D. R., & Rissman, E. F. (2005). Dopamine D5 receptor modulates male and female sexual behavior in mice. *Psychopharmacology (Berl)* (2), 206-214.
65. Larsson, K. (1979). Features of the neuroendocrine regulation of masculine sexual behavior. En: C. Beyer (Ed.), *Endocrine Control of Sexual Behavior* (págs. 77 - 163). New York : Raven Press.
66. Li, Q., Battaglia, G., & Van de Kar, L. D. (1997). Autoradiographic evidence for differential G-protein coupling of 5-HT_{1A} receptors in rat brain: lack of effect of repeated injections of fluoxetine. *Brain Res* (1), 141-151.
67. MacKenna, K. (1999). Ejaculation. En E. Knobil, & J. Neill, *Encyclopedia of reproduction* (págs. 1002 - 1008). New York : Academic Press.
68. Makarenko, I. G., Meguid, M. M., & Ugrumov, M. V. (2002). Distribution of serotonin 5-hydroxytryptamine 1B (5-HT_{1B}) receptors in the normal rat hypothalamus. *Neurosci Lett* (2), 155-159.
69. Marson, L., Platt, K. B., & McKenna, K. E. (1993). Central nervous system innervation of the penis as revealed by the transneuronal transport of pseudorabies virus. *Neuroscience* (1), 263 - 280.
70. Marson, L., & McKenna, K. E. (1994). Stimulation of the hypothalamus initiates the urethrogenital reflex in male rats. *Brain Res* (1-2), 103 - 108.

71. Marson, L., & McKenna, K. E. (1996). CNS cell groups involved in the control of the ischiocavernosus and bulbospongiosus muscles: a transneuronal tracing study using pseudorabies virus. *J Comp Neurol* (2), 161 - 179.
72. Mas, M., Fumero, B., Fernandez-Vera, J. R., & Gonzalez-Mora, J. L. (1995). Neurochemical correlates of sexual exhaustion and recovery as assessed by in vivo microdialysis. *Brain Res* (1-2), 13 - 19.
73. McCarty, E., & Dinsmore, W. (2012). Dapoxetine: an evidence-based review of its effectiveness in treatment of premature ejaculation. *Core Evid* (7), 1-14.
74. McMahon, C. G. (2010). Dapoxetine for premature ejaculation. *Expert Opin Pharmacother* (10), 1741-1752.
75. McMahon, C. G., Althof, S. E., Kaufman, J. M., Buvat, J., Levine, S. B., Aquilina, J. W., Tesfaye, F., Rothman, M., Rivas, D. A & Porst, H. (2011). Efficacy and safety of dapoxetine for the treatment of premature ejaculation: integrated analysis of results from five phase 3 trials. *J Sex Med* (2), 524-539.
76. McMahon, C. G. (2012). Dapoxetine: a new option in the medical management of premature ejaculation. *Ther Adv Urol* (4), 233-251.
77. McMahon, C. G., Jannini, E., Waldinger, M., & Rowland, D. (2013). Standard operating procedures in the disorders of orgasm and ejaculation. *J Sex Med* (1), 204 - 229.
78. Mengod, G., Martinez-Mir, M. I., Vilaró, M. T., & Palacios, J. M. (1989). Localization of the mRNA for the dopamine D2 receptor in the rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A* (21), 8560-8564.
79. Morales, A. (2012). Evolving therapeutic strategies for premature ejaculation: The search for on-demand treatment - topical versus systemic. *Can Urol Assoc J* (5), 380 - 385.
80. Mos, J., Mollet, I., Tolboom, J. T., Waldinger, M. D., & Olivier, B. (1999). A comparison of the effects of different serotonin reuptake blockers on sexual behaviour of the male rat. *Eur Neuropsychopharmacol* (1-2), 123-135.
81. Neve, K. A., Seamans, J. K., & Trantham-Davidson, H. (2004). Dopamine receptor signaling. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research* (24), 165 - 205.
82. Olayo Lortia, J., Ferreira Nuño, A., Velázquez Moctezuma, J., Morales Otal, A. (2014). Further definition on the multiple partner choice arena: a potential animal model for the study of premature ejaculation. *J Sex Med.* (10), 2428 - 2438.
83. Olivier, B., Chan, J. S., Pattij, T., de Jong, T. R., Oosting, R. S., Veening, J. G., & Waldinger, M. D. (2006). Psychopharmacology of male rat sexual behavior: modeling human sexual dysfunctions? *Int J Impot Res* (Suppl 1), S14-23.
84. Olivier, B., Chan, J. S., Snoeren, E. M., Olivier, J. D., Veening, J. G., Vinkers, C. H., Waldinger, M.D. & Oosting, R. S. (2011). Differences in sexual behaviour in male and female rodents: role of serotonin. *Curr Top Behav Neurosci* (8), 15-36.
85. Olivier, B. (2014). Serotonin: A never-ending story. *Eur J Pharmacol*. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.10.031.
86. Paglietti, E., Quarantotti, B. P., Mereu, G., & Gessa, G. L. (1978). Apomorphine and L-DOPA lower ejaculation threshold in the male rat. *Physiol Behav* (5), 559 -562.
87. Pattij, T., Olivier, B., & Waldinger, M. D. (2005). Animal models of ejaculatory behavior. *Curr Pharm Des* (31), 4069-4077.
88. Peeters, M., & Giuliano, F. (2008). Central neurophysiology and dopaminergic control of ejaculation. *Neurosci Biobehav Rev* (3), 438 - 453.

89. Pehek, E. A., Thompson, J. T., & Hull, E. M. (1989). The effects of intracranial administration of the dopamine agonist apomorphine on penile reflexes and seminal emission in the rat. *Brain Res* (1-2), 325 - 332.
90. Pfaus, J. G., & Phillips, A. G. (1991). Role of dopamine in anticipatory and consummatory aspects of sexual behavior in the male rat. *Behav Neurosci* (5), 727-743.
91. Piñeyro, G., & Blier, P. (1999). Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action. *Pharmacol Rev* (3), 533-591.
92. Pompeiano, M., Palacios, J. M., & Mengod, G. (1992). Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J Neurosci* (2), 440-453.
93. Porst H, H., McMahon, C. G., Althof, S. E., Sharlip, I., Bull, S., Aquilina, J. W., & Rivas, D. A. (2010). Baseline characteristics and treatment outcomes for men with acquired or lifelong premature ejaculation with mild or no erectile dysfunction: integrated analyses of two phase 3 dapoxetine trials. *J Sex Med* (6), 2231-2242.
94. Price, G. W., Roberts, C., Watson, J., Burton, M., Mulholland, K., Middlemiss, D. N., & Jones, B. J. (1996). Species differences in 5-HT autoreceptors. *Behav Brain Res* (1-2), 79-82.
95. Pryor, J. L., Althof, S. E., Steidle, C., Rosen, R. C., Hellstrom, W. J., Shabsigh, R., Dapoxetine Study Group. (2006). Efficacy and tolerability of dapoxetine in treatment of premature ejaculation: an integrated analysis of two double-blind, randomised controlled trials. *Lancet* (9539), 929-939.
96. Pytliak, M., Vargová, V., Mechírová, V., & Felšöci, M. (2011). Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications. *Physiol Res* (1), 15-25.
97. Rodríguez Manzo, G., Pellicer, F., Larsson, K., & Fernández-Guasti, A. (2000). Stimulation of the medial preoptic area facilitates sexual behavior but does not reverse sexual satiation. *Behav Neurosci* (3), 553 - 560.
98. Sachs, B., & Barfield, R. (1974). Copulatory behavior of male rats given intermittent electric shocks: theoretical implications. *J Comp Physiol Psychol* (86), 607-615.
99. Safarinejad, M. R. (2008). One-daily high-dose pindolol for paroxetine-refractory premature ejaculation: a double-blind, placebo-controlled and randomized study. *J Clin Psychopharmacol* (28), 39 - 44.
100. Sari, Y. (2004). Serotonin_{1B} receptors: from protein to physiological function and behavior. *Neurosci Biobehav Rev* (6), 565-582.
101. Savitz, J. L., Lucki, I., Drevets, W. C. (2009). 5-HT_{1A} receptor function in major depressive disorder. *Prog Neurobiol* (1), 17 - 31.
102. Schlegel, P. N., & Walsh, P. C. (1987). Neuroanatomical approach to radical cystoprostatectomy with preservation of sexual function. *J Urol* (138), 1402 - 1406.
103. Seeman, P., Chau-Wong, M., Tedesco, J., & Wong, K. (1975). Brain receptors for antipsychotic drugs and dopamine: direct binding assays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* (72), 4376-4380.
104. Sønksen, J., Biering-Sørensen, F., & Kristensen, J. K. (1994). Ejaculation induced by penile vibratory stimulation in men with spinal cord injuries. The importance of the vibratory amplitude. *Paraplegia* (10), 651 - 660.
105. Snoeren, E. M., Veening, J. G., Olivier, B., Oosting, R.S. (2014). Serotonin 1A receptors and sexual behavior in male rats: a review. *Pharmacol Biochem Behav* (121), 102-114
106. Sura, A., Overstreet, D. H., & Marson, L. (2001). Selectively bred male rat lines differ in naïve and experienced sexual behavior. *Physiol Behav* (1-2), 13-20.

107. Truitt, W. A., Shipley, M. T., Veening, J. G., & Coolen, L. M. (2003). Activation of a subset of lumbar spinothalamic neurons after copulatory behavior in male but not female rats. *J Neurosci* (23), 325 - 331.
108. van der Staay, F. J. (2006). Animal models of behavioral dysfunctions: basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. *Brain Res Rev* (52), 131-159.
109. van der Staay, F. J., Arndt, S. S., & Nordquist, R. E. (2009a). Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders. *Behav Brain Funct*, 25, 5-11.
110. van der Staay, F. J., Arndt, S. S., & Nordquist, R. E. (2009b). The standardization-generalization dilemma: a way out. *Genes Brain Behav* (9), 849-855.
111. Van Tol, H. H., Bunzow, J. R., Guan, H. C., Sunahara, R. K., Seeman, P., Niznik, H. B., & Civelli, O. (1991). Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* (6319), 610-614.
112. Veening, J. G., & Coolen, L. M. (1998). Neural activation following sexual behavior in the male and female rat brain. *Behav Brain Res* (92), 181 - 193.
113. Ver Voort, S. M. (1987). Ejaculatory stimulation in spinal-cord injured men. *Urology* (3), 282- 289.
114. Waldinger, M. D., & Olivier, B. (1998). Selective serotonin reuptake inhibitor-induced sexual dysfunction: clinical and research considerations. *Int Clin Psychopharmacol* (Suppl 6), S27-33.
115. Waldinger, M. D. (2002). The neurobiological approach to premature ejaculation. *J Urol* (168), 2359–2367.
116. Waldinger, M. D., & Olivier, B. (2005). Animal models of premature and retarded ejaculation. *World J Urol* (23), 115–118.
117. Waldinger, M. D., Zwinderman, A. H., Olivier, B., & Schweit, D. H. (2005). Proposal for a definition of lifelong premature ejaculation based on epidemiological stopwatch data. *J Sex Med* (2), 498-507.
118. Waldinger, M. D., Schweitzer, D. H., & Olivier, B. (2006). Dapoxetine treatment of premature ejaculation. *Lancet* (9550), 1869-1870.
119. Wang, R., Domer, F. R., Sikka, S. C., Kadowitz, P. J., & Hellstrom, W. J. (1994). Nitric oxide mediates penile erection in cats. *J Urol* (151), 234 - 237.
120. Willner, P. (1984). The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)* (1), 1 - 16.
121. Yokoyama, C., Okamura, H., Nakajima, T., Taguchi, J., & Ibata, Y. (1994). Autoradiographic distribution of [3H]YM-09151-2, a high-affinity and selective antagonist ligand for the dopamine D2 receptor group, in the rat brain and spinal cord. *J Comp Neurol* (1), 121-136.
122. Young, B., Coolen, L., & McKenna, K. (2009). Neural regulation of ejaculation. *J Sex Med* (3), 229 - 33.

20. ANEXOS: ARTÍCULO PUBLICADO

ORIGINAL RESEARCH—BASIC SCIENCE

**Further Definition on the Multiple Partner Choice Arena:
A Potential Animal Model for the Study of Premature Ejaculation**

Jesús Olayo-Lortia, Biól Exp,*† Armando Ferreira-Nuño, PhD,† Javier Velázquez-Moctezuma, PhD,† and Adriana Morales-Otal, PhD†

*Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City, Mexico; †Área de Neurociencias, Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City, Mexico

DOI: 10.1111/jsm.12637

ABSTRACT

Introduction. The multiple partner choice arena (MPCA) is an experimental setup in which male rats display a significant shortening of ejaculation latency, which is the main characteristic of premature ejaculation (PE) in men. Thus, the MPCA is a potential animal model for PE.

Aim. In this study, we further analyze whether the features of the MPCA satisfy the validity criteria for it to be considered an animal model as well as the possible participation of the serotonergic system in the faster ejaculation exhibited by male rats in the MPCA.

Methods. In Experiment 1, male rats were tested in a standard arena to assess their sexual behavior, then were assessed 1 week later in the MPCA. Another group was first tested in the MPCA, then in a standard arena. In Experiment 2, male rats divided into two groups were treated daily with WAY-100635 (5-HT_{1A} antagonist) or vehicle for 15 days. In each group, half of the subjects were tested in a standard arena and half were tested in the MPCA on days 1, 8, and 15 of treatment.

Main Outcome Measures. Number of intromissions and intromission and ejaculation latencies were the main outcome measures.

Results. In Experiment 1, males tested in the MPCA ejaculated significantly faster, regardless of the order in which they were evaluated in both arenas. In Experiment 2, the administration of WAY-100635 increased intromission and ejaculation latencies, and the number of intromissions in the MPCA.

Conclusions. The results obtained in the MPCA support its use as an animal model for PE evaluation. **Olayo-Lortia J, Ferreira-Nuño A, Velázquez-Moctezuma J, and Morales-Otal A. Further definition on the multiple partner choice arena: A potential animal model for the study of premature ejaculation. J Sex Med 2014;11:2428–2438.**

Key Words. Animal Models; Premature Ejaculation; Validation Criteria; Sexual Behavior; Serotonin Receptors

Introduction

Premature ejaculation (PE) in male humans is a sexual dysfunction characterized by an ejaculation that always or nearly always occurs prior to or within about 1 minute of vaginal penetration, the inability to delay ejaculation in all or nearly all vaginal penetrations, and the negative personal consequences including distress, frustration, and/or the avoidance of sexual intimacy [1,2].

Additionally, PE is a prevalent, yet often underdiagnosed, sexual disorder that affects men of all ages [3] with a global prevalence of 30% [4,5]. Because of the impact this disorder has on sexual health in males, PE has been studied clinically and in animal studies (the rat, for example) for over 20 years [1].

Neurochemically, the ejaculatory reflex involves a complex interplay between central serotonergic and dopaminergic neurons, with secondary

involvement of cholinergic, adrenergic, oxytocinergic, and gamma aminobutyric acid (GABAergic) neurons [2,6]. Although different neurotransmitters are involved in the neurobiology of ejaculation, dopamine and serotonin have emerged as essential neurochemical factors. For example, dopamine promotes seminal emission/ejaculation via D_2 receptors, whereas serotonin inhibits ejaculation via 5-HT_{2C} receptors. Moreover, serotonergic neurons are widely distributed in the brain and spinal cord and are predominantly found in the brainstem, raphe nuclei, and the reticular formation [2]. Although multiple serotonin (5-hydroxytryptamine [5-HT]) receptors have been characterized [7], stimulation of the 5-HT_{2C} receptor with 5-HT_{2C} agonists results in a delay of ejaculation in male rats, whereas stimulation of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors results in a shortened ejaculation latency (EL) [8], leading to Waldinger's hypothesis that men with PE may have hyposensitivity of 5-HT_{2C} receptors and/or hypersensitivity of 5-HT_{1A} receptors [1,9–11].

On the other hand, animal models play an essential role in scientific research on behavior and physiological mechanisms, as well as in pathological research involving normal or abnormal behavioral control [12]. Most of the current knowledge of the anatomy and neurobiology of sexual behavior is based on studies that used animal models, among which the rat stands out [13,14].

Sexually experienced rats have been used as an animal model to understand the neurobiological mechanisms of sexual behavior, as well as different sexual disorders, including PE [13]. It has been suggested that to be validated, an animal model must satisfy certain previously established criteria [13,14]. In 1984, Willner proposed the following criteria that must be satisfied by animal models used to study neurobehavioral disorders: face validity, construct validity, and predictive validity [15]. Face validity refers to the extent to which the proposed animal model is capable of replicating the disorder being studied as it is exhibited in humans. The replication of symptoms corresponding to the disorder can be the starting point to develop an animal model and identify its potential to facilitate the study of certain neurobehavioral disorders such as PE [15,16]. Construct validity refers to the extent to which the animal model is consistent with a proposed theory on the disorder or physiological phenomenon being studied [15]. This validation criterion is often considered to be one of the most important to develop an animal model because it shows that

the proposed model has a solid theoretical foundation [16]. Lastly, predictive validity refers to the extent to which the animal model is capable of responding to drugs designed to regulate the disorder or physiological phenomenon being studied [15].

On the other hand, research carried out on the etiology of PE and the development of therapeutic agents targeting this disorder have made it difficult to develop a standard animal model to study it. The animal model currently used to study PE consists of a standard arena (SA), which can be a rounded acrylic enclosure (50×40 cm) inside of which the sexual behavior of sexually experienced male rats is recorded for 30 minutes. Once the basal levels of sexual activity are recorded, drugs thought to delay ejaculation are administered to the male rats. If ejaculation is delayed, the dosage and duration of treatment necessary to do so is determined [13,14]. This animal model has been shown to satisfy the criteria of predictive validity proposed by Willner [15] as ejaculation in male rats has been delayed with drugs designed to regulate PE. Nevertheless, this model does not achieve face validity because even though the drugs delay ejaculation, male rats do not initially exhibit signs of PE. Lastly, it must be taken into account that animal models that are more suitable to studying PE will lead to the development of more effective therapeutic treatments [13,14].

Regarding the latter, Ahlenius et al. [8] showed that stimulation of the 5-HT_{2C} receptor delays ejaculation in male rats, while stimulation of the 5-HT_{1A} receptor significantly reduces EL. In 2005, de Jong et al. [17] showed that coadministration of WAY-100635, a selective 5-HT_{1A} receptor antagonist, and citalopram, a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI), completely inhibited ejaculation. The authors reported a complete ejaculatory inhibition after chronic administration. Other studies have also shown that different chronically administered SSRIs delay ejaculation in sexually experienced rats [17–21]. Dapoxetine and sertraline are the SSRIs with the greatest efficacy for increasing ejaculatory latency in male rats and humans [19–21].

Given this background, our research team recently developed a multiple partner choice arena (MPCA) to study the sexual behavior of rats [22]. This arena consists of four acrylic cylinders arranged in a circle, forming a central compartment from which a receptive female rat is able to choose one of four males (one in each cylinder) with which to copulate. In these conditions, we

observed that males achieve ejaculation faster (fewer intromissions and reduced EL) when competing with each other for a female than when they are tested in an SA. For example, in other studies, it has been demonstrated that in the SA, male rats usually need 8–11 intromissions to reach the first ejaculation, with a mean ejaculatory latency of 420 seconds [23–25]. Later, in the second ejaculatory series, a notable reduction in these sexual parameters is observed (approximately 6 intromissions and 300 seconds of ejaculatory latency). However, in the subsequent ejaculatory series, these parameters begin to increase progressively until the male reaches its sexual satiety. Compared with rats in the SA, we can demonstrate that the male rat tested in the MPCA reaches his first ejaculation earlier (a mean of 100 seconds of ejaculatory latency and 4.7 intromissions), showing similar signs to those presented in the PE in men [26], although this criterion has not yet been established in male rats. These results suggest that if the MPCA satisfies the three criteria proposed by Willner, this arena may be more suitable for studying PE than the current animal model. Therefore, the aim of this study was to investigate whether MPCA is a potential animal model for the evaluation of PE.

Methods

Housing and Use of Animals

Adult male and female (200 ± 50 g bodyweight) Wistar rats were obtained from our breeding colony at the Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (IMexico D.F. Mexico) and were placed in plexiglass cages (40 cm \times 30 cm \times 40 cm, 5 rats per cage) in a climate-controlled room maintained at 24°C (75.2°F) with a 12:12 light–dark cycle (lights on at 20:00) and given Purina Chow (Harlan Laboratories, Inc., Indianapolis, IN, USA) and water ad libitum. All experiments and procedures performed in this study were approved by the Universidad Autónoma Metropolitana ethics committee, in compliance with the Guide for the Use and Care of Laboratory Animals and with the Official Mexican Standard for the Use and Care of Animals (NOM-062-ZOO-1999).

Selection and Preparation of Animals

Twenty female rats (stimulus females) were anesthetized with a 0.3 mL ketamine/xylazine mixture (70 mg/mL and 6 mg/mL, respectively) before undergoing bilateral ovariectomies. After

a 2-week recovery period, 10 μ g/rat estradiol benzoate (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 0.5 mg progesterone/rat (Sigma Aldrich) were injected subcutaneously (SC) at 48 hours and 4 hours, respectively, before the test to induce sexual receptivity. Females exhibiting a lordosis quotient (LQ = number of lordosis postures/10 attempted mounts from a male \times 100) of at least 90% were selected for the tests.

Similarly, in order to standardize the sexual performance of males used in the present study, they were paired every other day, three consecutive times, with female rats from the stimulus group receiving the aforementioned hormone treatment, resulting in 20 sexually experienced males that had ejaculated on at least two occasions during 15-minute tests.

Habituation of Animals to the MPCA

To habituate the stimulus females and the males to the MPCA, the following procedures were followed: four transparent acrylic cylinders measuring 50 cm in height by 40 cm in diameter were arranged in a circle, creating a small central compartment where a female was placed at the onset of the test. At the bottom of each cylinder, there was an opening (4 \times 5 cm) through which only the female could pass, because of her smaller body size. These openings faced the central compartment, giving the female access to the cylinders and therefore allowing her to choose a male with which to copulate.

In the first two habituation tests, which were carried out every other day, each of the 20 stimulus females was individually placed in the central compartment of the MPCA, having received no hormone treatment and allowed to explore the four empty cylinders for 15 minutes. In the subsequent two habituation tests, the 20 females were given the previously described hormone treatment to induce receptivity, then individually placed inside the central compartment without access to the cylinders for 5 minutes. Before placing the female inside the central compartment, one sexually experienced male rat was placed inside each of the four surrounding cylinders. Following the 5-minute habituation period, the stimulus female was removed from the central compartment, the cylinders were rotated to leave the openings facing the central compartment, and the stimulus female was returned to the central compartment, allowing her to choose a male to interact with. The objective of this habituation test was to allow the males, as well as the female, to become familiar with the

arena and to associate it with sexual activity and competition.

Experiment 1: Comparison of Male Sexual Behavior in an SA and in the MPCA

In the case of PE, an animal model that permits male rats to ejaculate faster, thus exhibiting similar patterns to PE, would satisfy the face validity. As noted above, our research team designed an innovative model, the MPCA [23], to study the sexual behavior of rats. We questioned whether the reduced ejaculatory latency of the males in the MPCA may have been a result of the sexual experience they acquired beforehand in the SA. The present study sought to determine whether male rats ejaculate faster in the MPCA, independently of the order in which the arenas are tested or whether prior experience in the arenas may have an influence on the results obtained in the MPCA.

Methodology of Experiment 1

Sexual Behavior Tests in the SA

Two groups of 10 sexually experienced male (470 ± 70 g body weight) Wistar rats were used in this experiment. The first group (Group I) of males was evaluated for the first week in the SA. The test lasted until either every male had ejaculated. Each male (previously selected and marked) was placed inside the SA with woodchip bedding for a 5-minute habituation period. Upon completion of the habituation period, a stimulus female that had exhibited an LQ of 90% was placed in the arena and the following parameters were recorded: mount latency (ML: time from introduction of the female to first mount), intromission latency (IL: time from introduction of the female to first intromission), number of mounts (NM), number of intromissions (NI) preceding each ejaculation, EL (time from first intromission to ejaculation), and copulatory efficiency or hit rate (HR: number of intromissions/(number of mounts + number of intromissions)).

These males were given 1 week of inactivity following the test, after which they were evaluated in the MPCA as described below.

Sexual Behavior Tests in the MPCA

Once the males and females were habituated to the MPCA, we recorded their sexual behavior in the arena. To do so, hormone-treated females with LQs of at least 90% were selected. Males were identified with a mark on the tail and were evaluated in groups of four. Males were required to have had at least 1 week of sexual inactivity immediately

prior to this test. One sexually experienced male was placed in each cylinder and a female was placed in the central compartment (with no access to the interior of the cylinders) for a 5-minute habituation period. Upon completion of this period, the female was removed from the central compartment and the cylinders were rotated to make their openings face the central compartment. The female was again placed inside the central compartment, and the following parameters were recorded: the time when the female entered and exited each cylinder and the NM, NI, and HR of each male, ML, IL, and EL were recorded taking into account only the time during which the female remained inside the cylinder of each male. Following the first ejaculation of each male, we rotated the opening away from the central compartment once the female exited the cylinder to prevent the female from repeatedly copulating with the same male. The test continued until the four males achieved their first ejaculation.

One week later, the test in the SA was carried out. Both tests, in the SA and in the MPCA, were performed during the dark period.

The second group of males (Group II) was evaluated for the first week in the MPCA as described above, with tests lasting until each male achieved its first ejaculation. They were then given 1 week of inactivity, after which they were evaluated in the SA following the methodology described above.

Statistical Analysis

The mean value \pm standard deviation (SD) of each parameter of sexual behavior obtained for the males in each arena (SA vs. MPCA) was compared using the nonparametric Wilcoxon signed-rank test with GB-STAT statistical analysis software (version 10.0; Dynamic Microsystems, Inc., Silver Spring, MD, USA), at a level of significance of less than 0.05.

Experiment 2: Evaluation of the Effect of a Serotonin 5-HT_{1A} Receptor Antagonist on the Sexual Behavior of Adult Male Rats in the SA and in the MPCA

Waldinger's theory proposes that one of the possible causes of PE is a hypersensitivity of 5-HT_{1A} receptors. So far, there is no clinical evidence to show that the 5-HT_{1A} receptor is involved in PE. Although it has been demonstrated that activation of 5-HT_{1A} receptor stimulates ejaculation in rats [8], the effect of the antagonists of this receptor has been unclear in male rats tested in the SA [17]. Therefore, in this study, we are interested in

analyzing whether this receptor is involved in rapid ejaculation in male rats in the MPCA. To this end, using a study by de Jong et al. [17] as a reference, we analyzed the effects of chronic administration of WAY-100635 over 15 days on the sexual behavior of male rats in both the MPCA and the SA in an effort to determine whether this treatment delays the faster ejaculation exhibited by males in the MPCA.

Methodology of Experiment 2

Twenty-eight adult male (450 ± 50 g body weight) and female Wistar rats were used in this experiment. These rats were housed and managed under the conditions described above in the general methods section. Prior to the study, the 28 males were randomly divided into two groups of 14. One of these groups was evaluated in the SA and the other in the MPCA until the first ejaculatory series was achieved. This was performed to obtain a basal record of sexual behavior for each arena. After 1 week, the first group (vehicle [VEH], $n = 14$) received 0.03 mL saline solution SC for 15 consecutive days, while the second group (WAY, $n = 14$) received 0.1 mg/kg of the 5-HT_{1A} antagonist N-[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-(2-pyridinyl) cyclohexane carboxamide 3HCl (WAY-100635; Sigma Aldrich) dissolved in 0.03 mL saline solution and administered SC for 15 consecutive days, in accordance with the treatment described by de Jong et al. [17]. Seven males from each group were chosen at random and evaluated on days 1, 8, and 15 of treatment in the SA until the first ejaculation. The other seven males of each group were evaluated in the MPCA, using the same criteria. Thus, the males were divided into the following groups: SA-VEH, SA-WAY, MPCA-VEH, and MPCA-WAY. The treatment was administered 1 hour before the experiment began. The following parameters of sexual behavior were recorded for each arena: ML, IL, EL, NM, NI, and HR. We followed the same guidelines expressed in the first experiment regarding the time of day the tests were performed and the method to calculate latency times.

Statistical Analysis

The means of each sexual parameter obtained in the SA and MPCA were compared among the two treatment groups (VEH, WAY) over the 15 days of treatment using two-factor analyses of variance (ANOVAs). Newman-Keuls tests were used to probe for significant differences among individual

means. Data analyses were performed with SPSS statistical analysis software (version 21.0; SPSS, Inc., Chicago, IL, USA), at a level of significance of less than 0.05.

Results

Experiment 1

The results of the Wilcoxon signed-rank test (Figure 1) show that when tested in the MPCA (independently of the order in which they were tested in the two arenas), males of both groups exhibited a significant reduction in the mean \pm SD of the following parameters: IL (Group I, SA = 57.1 ± 6.15 seconds vs. MPCA = 4.7 ± 0.82 seconds; Group II, MPCA = 3.3 ± 0.48 seconds vs. SA = 34.6 ± 5.6 seconds, $P < 0.01$ in both groups, Figure 1A,B) and NI (Group I, SA = 11 ± 1.3 vs. MPCA = 6 ± 1.2 ; Group II, MPCA = 7.1 ± 1.19 vs. SA = 10 ± 1.94 , $P < 0.05$ in both groups, Figure 1C,D). It is worth noting that the male rats exhibited a greater reduction in EL ($P < 0.01$, Figure 1E,F) when tested first in the SA and later in the MPCA (685.34 ± 86.69 seconds vs. 326.7 ± 37.13 seconds, respectively) than when tested first in the MPCA and later in the SA ($P < 0.05$, 114 ± 18.15 seconds vs. 466 ± 70.55 seconds, respectively). No significant differences were obtained in the rest of the sexual parameters (ML, NM, and HR).

Experiment 2

Figure 2 shows the mean \pm SD values of IL, EL, and NI for groups VEH and WAY-100635 under the two experimental conditions evaluated (MPCA and SA) over the course of the 15 days during which the treatment was administered. The results show that WAY progressively increased the IL, EL, and NI in both arenas during the days of treatment. Regarding IL, a two-way ANOVA analysis (arena treatment) revealed a significant interaction between arena and treatment on days 1 ($F_{[1, 27]} = 12.42$), 8 ($F_{[1, 27]} = 11.96$), and 15 ($F_{[1, 27]} = 11.19$), with a significance of $P < 0.003$ in the three cases (Figure 2A). WAY-100635 treatment produced a higher increment in IL in male rats tested in the SA than those evaluated in the MPCA. To determine differences on the day of treatment, a Newman-Keuls post hoc test was applied. Pairwise multiple comparisons in IL revealed that on the first day of treatment, a significant reduction ($P < 0.05$) was observed in group MPCA-VEH (mean \pm SD = 3.5 ± 1.13 seconds) when compared

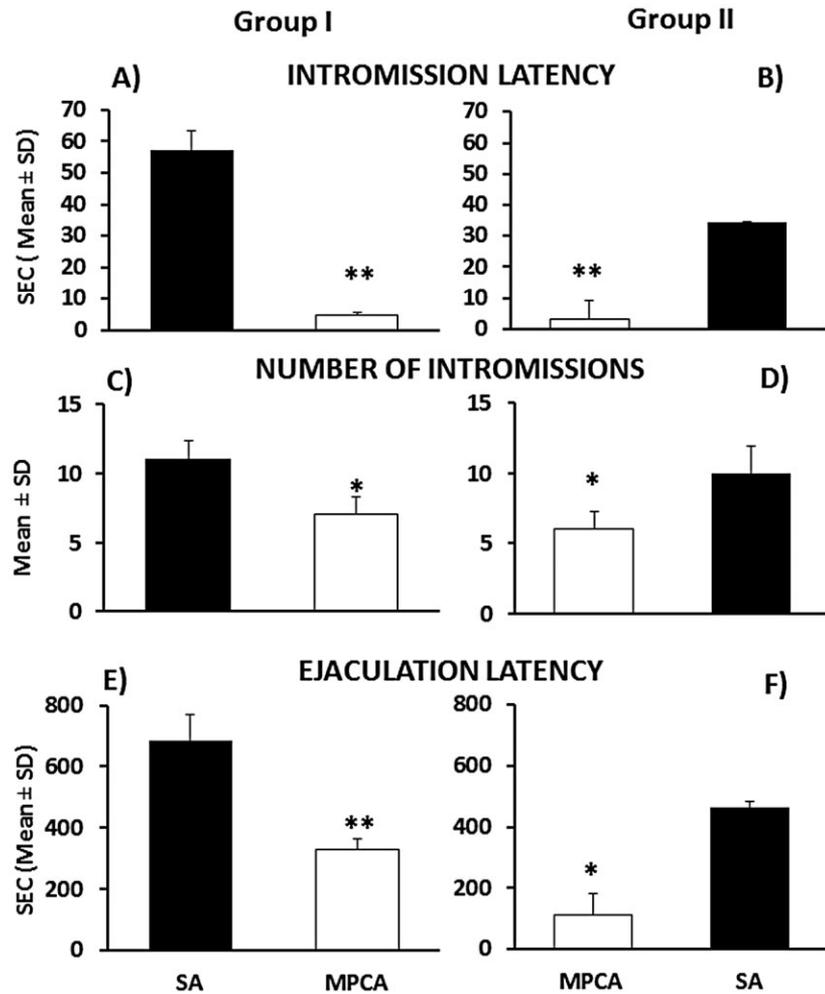


Figure 1 Mean \pm SD of intromission latency (A,B). Number of intromissions (C,D) and ejaculation latency (E,F) achieved by two groups of sexually experienced male rats ($n=10$ per group), during the first copulatory series after being tested in two different arenas: standard arena (SA, black bars) and multiple partner choice arena (MPCA, white bars). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ after Wilcoxon rank test. SD = standard deviation; SEC = seconds.

with group SA-VEH (11.85 ± 1.46 seconds). Later, on day 8, an even more significant ($P < 0.01$) reduction was observed in group MPCA-VEH (3 ± 1.52 seconds) when compared with group SA-VEH (10.14 ± 1.34 seconds). Finally, on day 15, we again observed a significant reduction ($P < 0.05$) in group MPCA-VEH (3.5 ± 1.27 seconds) when compared with group SA-VEH (12.5 ± 1.90 seconds). Additionally, it was possible to observe a gradual increase in IL over the course of the treatment in the group that received WAY-100635 and was evaluated in the MPCA. On day 8, this gradual increase proved to be significant ($P < 0.05$) when compared with the vehicle control group evaluated in the same arena (MPCA-WAY, 10.7 ± 2.2 seconds vs. MPCA-VEH, 3 ± 1.52 seconds). Finally, on day 15, this increase was observed to be even greater (MPCA-WAY, 13.74 ± 2.75 seconds vs. MPCA-VEH, 3.5 ± 1.27 seconds, $P < 0.01$). It was possible to observe the same effect of the treatment in group

SA-WAY. On day 8, this gradual increase proved to be significant ($P < 0.05$) when compared with the vehicle group tested in the SA (SA-WAY, 24.7 ± 3.9 seconds vs. SA-VEH, 10.14 ± 1.3 seconds). On day 15, this increase was greater ($P < 0.01$) between the same groups (SA-WAY, 30.7 ± 5.2 seconds vs. SA-VEH, 12.5 ± 1.9 seconds).

Regarding EL, a significant interaction between arena and treatment was also observed on days 8 [$F_{(1, 27)} = 5.28$, $P < 0.03$] and 15 [$F_{(1, 27)} = 25.65$, $P < 0.0001$]. In this case, the males treated with WAY-100635 and tested in the MPCA showed a higher increase in the EL than males receiving WAY-100635 but evaluated in the SA. The Newman-Keuls post hoc tests revealed that in comparison with the SA-VEH group, males of the MPCA-VEH group exhibited a significant reduction ($P < 0.01$) in EL on days 1 (MPCA-VEH, 84.2 ± 8.8 seconds vs. SA-VEH, 205.8 ± 13.3 seconds), 8 (MPCA-VEH, 85.1 ± 10.2 seconds vs.

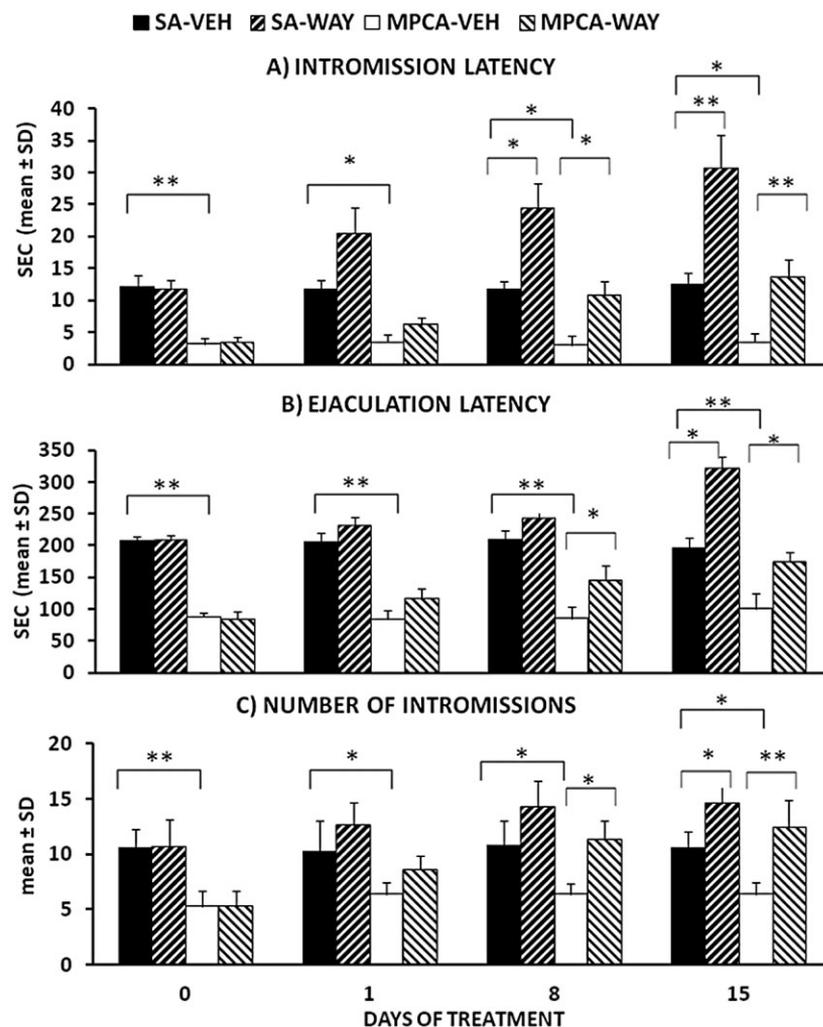


Figure 2 Effect of WAY-100635 (WAY) and vehicle (VEH) after acute treatment (1, 8, and 15 days) on the intromission latency (A), ejaculation latency (B), and number of intromissions (C) of sexually expert males ($n=7$, per group), obtained during the first copulatory series, once they were tested in a standard arena (SA) or in the multiple partner choice arena (MPCA). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, after two-way analysis of variance (ANOVA), followed by post hoc test of Newman–Keuls. SD = standard deviation; SEC = seconds.

SA-VEH, 209.4 ± 14.6 seconds), and 15 (MPCA-VEH, 100.5 ± 12.2 seconds vs. SA-VEH, 195.2 ± 16.5 seconds) of treatment (Figure 2B). Additionally, over the course of treatment with WAY-100635, the males evaluated in the MPCA exhibited a gradual increase in EL when compared with the vehicle group tested in the same arena. This increase was significant ($P < 0.05$) on days 8 (MPCA-WAY, 146.8 ± 21.6 seconds vs. MPCA-VEH, 85.1 ± 10.2 seconds) and 15 (MPCA-WAY, 175.8 ± 14.5 seconds vs. MPCA-VEH, 100.5 ± 12.2 seconds) of treatment. Similarly, an increase in this parameter was observed over the course of treatment in the group of males that received WAY-100635 and were evaluated in the SA. Nevertheless, when compared with EL in the vehicle group evaluated in the same arena, this increase reached statistical significance ($P < 0.05$) only on day 15 of treatment (SA-WAY, 325.2 ± 8.9 seconds vs. SA-VEH, 195.2 ± 6.2 seconds).

Lastly, in regard to the NI, no interaction was observed between the arena and treatment after the two-way ANOVA. However, analysis of the NI yielded results similar to those seen for IL and EL because the males in the vehicle group evaluated in the MPCA exhibited an NI lower than that seen in the SA over the course of treatment. With the Newman–Keuls post hoc test, this decrease proved to be significant ($P < 0.05$; Figure 2C) when compared with the males in the vehicle group on days 1 (MPCA-VEH, 6.3 ± 1.11 vs. SA-VEH, 10.3 ± 2.69), 8 (MPCA-VEH, 6.4 ± 0.97 vs. SA-VEH, 10.9 ± 2.19), and 15 of treatment (MPCA-VEH, 6.3 ± 1.11 vs. SA-VEH, 10.6 ± 1.39). Again, a gradual increase over the course of treatment was observed in the group treated with WAY-100635 and evaluated in the MPCA compared with the vehicle group tested in the same arena. This increase was statistically significant (Figure 2C) on days 8 (MPCA-WAY, 11.3 ± 1.70 vs. MPCA-

VEH, 6.4 ± 0.97 , $P < 0.05$.) and 15 of treatment (MPCA-WAY, 12.4 ± 2.5 vs. MPCA-VEH, 6.3 ± 1.11 , $P < 0.01$). The group of males treated with WAY-100635 and evaluated in the SA also exhibited a gradual increase in the NI because of the effects of the drug. However, only on the final day of treatment did this increase achieve significance ($P < 0.05$) when compared with the NI exhibited by the vehicle group in the same arena (SA-WAY, 14.6 ± 0.81 vs. SA-VEH, 10.6 ± 0.52). No significant differences were observed in the rest of the sexual parameters (ML, NM, and HR).

In summary, administration of WAY-100635 to males evaluated in the MPCA resulted in a progressive increase in the three aforementioned parameters (IL, NI, and EL). By the final day of treatment, these parameters were at levels similar to those exhibited by the males evaluated in the SA.

Discussion

Experiment 1

In this study, we present evidence that the MPCA satisfies some of the criteria of validity given by Willner in 1984 and is therefore a potential animal model for the evaluation of PE [15]. In the first experiment, when tested in the MPCA, male rats exhibited signs similar to PE (i.e., a significant reduction in EL and NI) as well as a reduction of IL (which is not considered a sign of PE) regardless of the order in which they were tested in the two arenas. This finding is consistent with the results we obtained in a previous study [23]. Furthermore, the first experiment in this study corroborated this result, demonstrating that the MPCA achieved face validity because male rats in the arena exhibit behaviors similar to those observed in human cases of PE. This shows that the conditions imposed by the MPCA cause males to ejaculate sooner than in the SA and for this reason, our model may be more representative of acquired PE than lifelong PE. Moreover, it was possible to confirm that previous experience acquired by the males in the arena generally did not have an important influence on the time required to achieve ejaculation. With the exception of EL (Figure 1E,F), males tested first in the MPCA and later in the SA exhibited a significant reduction in measured parameters (from $P < 0.01$ to $P < 0.05$) compared with those tested first in the SA and later in the MPCA. The fact that the reduction in EL remains irrespective of the order of the two tests indicates that it is not an artifact

due to experience but a true EL reduction due to the MPCA. However, to have a greater effect on EL, it might be better to subject rats to the SA first and then to the MPCA. It is possible that mating competition between males in the MPCA induced some form of stress or anxiety capable of lowering their ejaculatory threshold. Indeed, Waldinger et al. have suggested that anxiety may be one of the etiological factors of PE [27]. However, further studies are required to ascertain whether it is anxiety resulting from competition with other males that causes the rats to ejaculate sooner in the MPCA. Nevertheless, although we were able to demonstrate in a previous study that male rats ejaculate sooner when they compete for a stimulus female in the MPCA [26], there are few studies in which two or more males have been simultaneously paired with a receptive female to analyze the effect this has on the speed of ejaculation. There is some evidence suggesting that certain stress-inducing tactile stimuli, such as electric shocks to the paw or tail pinches, are capable of stimulating ejaculation in male rats [13,26,28–30]. However, some researchers have suggested that this facilitatory effect is mediated by the activation of the dopaminergic system instead the serotonergic system [30].

On another note, it is worth emphasizing that although our data suggest that the MPCA achieves face validity as a potential model for studying PE and that this disorder in humans can be caused by stress or anxiety, the MPCA does not satisfy the criteria of reliability/replicability proposed by van der Staay et al. [16,31] because, unlike the faster ejaculation exhibited by male rats in the MPCA, PE in humans does not occur as a result of competition for a mate.

Experiment 2

The second experiment in this study was performed to determine whether 5-HT_{1A} receptors are involved in the faster ejaculation exhibited by male rats in the MPCA. If this were the case, this response would be corrected through administration of WAY-100635. This is indeed what occurred over the course of treatment, up to day 15; values for IL, EL, and NI were similar to those exhibited by rats in the SA.

Additionally, it is possible to observe in the EL and NI results, that the differences between the SA-VEH and MPCA-VEH were constant throughout the 15-day testing period because in both groups, the subjects were sexually experienced males that had shown a similar sexual performance.

In the case of the WAY-treated groups, although a similar increase was observed on the SA-WAY and MPCA-WAY groups, a higher effect of WAY-100635 was obtained in the MPCA. It is likely that the WAY-100635 treatment produces a higher increase in the serotonin released at the synaptic level, when males are tested in the MPCA, but it is necessary to measure the amount of serotonin released to confirm this hypothesis.

Therefore, our data suggest that quicker ejaculation exhibited by the male rats in the MPCA is possibly related to 5-HT_{1A} receptor hypersensitivity, as proposed by Waldinger in his theory on PE [8–10,14,17,32]. Unfortunately, to this date, the clinical studies in which the 5-HT_{1A} antagonist has been used in the treatment of PE are very scarce. There is only one study in which daily coadministration of 7.5 mg of pindolol (a partial beta-adrenoceptor/5-HT_{1A} receptor antagonist) and 20 mg of the SSRI paroxetine, in men with PE, showed satisfactory results in the treatment of this sexual dysfunction (a 3.9-fold increase in intravaginal EL time) [33]. However, in that study, the treatment was only better than placebo in improving PE in patients refractory to paroxetine and, for this reason, further investigation is necessary to document in clinical practice that 5-HT_{1A} receptor antagonists could have positive results in the treatment of PE.

It is worth mentioning that in the second experiment, the results we obtained with WAY-100635 differed from those published by de Jong et al. [17]. Despite having used the same dosage and treatment regimen, the study by de Jong et al. showed that WAY-100635 did not have a significant effect on ejaculation frequency, while having a variable effect on IL, EL, and intromission frequency of male rats tested in the type of SA. In contrast, we observed a significant effect of the drug on these parameters in the MPCA. It is possible that our results may differ because the rats used by de Jong et al. [17] belonged to a different breed. In addition to the difference in the rat breed, the conditions imposed by the MPCA on male rat sexual behavior were different from those of the SA, because the anxiety factor is only present in the MPCA. This condition could most likely change the neurotransmission involved in ejaculation, resulting in the higher effect obtained with WAY-100635 in the MPCA than in the SA, as was observed in the de Jong et al. study. However, further studies are needed to test this hypothesis.

Furthermore, experiments on the serotonin transporter with knockout rats suggest that the

absence of this transporter lowers the basal sexual performance of male rats. Pharmacological experiments suggest that separate pools of 5-HT_{1A} receptors regulate different aspects of sexual performance in male rats and that the 5-HT_{1A} receptor regulates different aspects of normal sexual performance in the rat [34]. Taking this into account, it is possible that the conditions imposed by the MPCA contribute to changes in 5-HT_{1A} receptor sensitivity or in serotonin transporter function, thereby altering sexual performance in male rats.

Lastly, it is worth noting that one advantage of the MPCA is that male rats spontaneously behave as “rapid” ejaculators without the need to administer drugs. Another advantage of this model is that 100% of the males evaluated in the MPCA have similar patterns to those found in humans suffering from PE, while in other studies the percentage of evaluated subjects that exhibit this phenomenon is approximately 10% in the type of SA [11,13,14].

In conclusion, the present study suggests that the MPCA could satisfy the criterion of face validity proposed by Willner [15] and provides evidence that the 5-HT_{1A} receptor could be involved in rapid ejaculation when male rats are evaluated in the MPCA. Then the MPCA is a potential animal model for evaluation of PE. However, it remains to be demonstrated whether the MPCA is capable of achieving predictive validity as well. To test this, it will be necessary to administer dapoxetine, a drug with demonstrated clinical efficacy in PE treatment, to male rats tested in the MPCA. This experiment is currently in progress and will be addressed in a future article. More studies are needed to determine whether the MPCA is truly a valid animal model to evaluate PE.

Corresponding Author: Adriana Morales-Otal, PhD, Área de Neurociencias, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biología de la Reproducción, San Rafael Atlixco SNo. 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, 09340, México, D.F., México. Tel: (52) 5558044600 ext 2723; Fax: (52) 5558042843; E-mail: otal@xanum.uam.mx

Conflict of Interest: The authors report no conflicts of interest.

Statement of Authorship

Category 1

(a) Conception and Design

Jesús Olayo-Lortia; Armando Ferreira-Nuño; Adriana Morales-Otal

(b) Acquisition of Data

Jesús Olayo-Lortia; Armando Ferreira-Nuño; Adriana Morales-Otal

(c) Analysis and Interpretation of Data

Jesús Olayo-Lortia; Armando Ferreira-Nuño; Adriana Morales-Otal

Category 2**(a) Drafting the Article**

Jesús Olayo-Lortia; Armando Ferreira-Nuño; Adriana Morales-Otal

(b) Revising It for Intellectual Content

Jesús Olayo-Lortia; Armando Ferreira-Nuño; Javier Velázquez-Moctezuma; Adriana Morales-Otal

Category 3**(a) Final Approval of the Completed Article**

Jesús Olayo-Lortia; Armando Ferreira-Nuño; Javier Velázquez-Moctezuma; Adriana Morales-Otal

References

- Althof SE, Abdo CH, Dean J, Hackett G, McCabe M, McMahon CG, Rosen RC, Sadovsky R, Waldinger MD, Becher E, Broderick GA, Buvat J, Goldstein I, El-Meliegy AI, Giuliano F, Hellstrom WJ, Incrocci L, Jannini EA, Park K, Parish S, Porst H, Rowland D, Segraves R, Sharlip I, Simonelli C, Tan HM. International society for sexual medicine's guidelines for the diagnosis and treatment of premature ejaculation. *J Sex Med* 2010;7:2947–69.
- McMahon CG, Jannini E, Waldinger MD, Rowland D. Standard operating procedures in the disorders of orgasm and ejaculation. *J Sex Med* 2013;10:204–29.
- Jannini EA, Maggi M, Lenzi A. Evaluation of premature ejaculation. *J Sex Med* 2011;8(suppl 4):328–34.
- Laumann EO, Paik A, Rosen RC. Sexual dysfunction in the United States: Prevalence and predictors. *JAMA* 1999;281:537–44.
- Waldinger MD. Toward evidence-based genetic research on lifelong premature ejaculation: A critical evaluation of methodology. *Korean J Urol* 2011;52:1–8.
- Rowland D, McMahon CG, Abdo C, Chen J, Jannini E, Waldinger MD, Ahn TY. Disorders of orgasm and ejaculation in men. *J Sex Med* 2010;4(Pt 2):1668–86.
- Peroutka SJ, Snyder SH. Multiple serotonin receptors: Differential binding of [3H]5-hydroxytryptamine, [3H]lysergic acid diethylamide and [3H]spiperidol. *Mol Pharmacol* 1979;16:687–99.
- Ahlenius S, Larsson K, Svensson L, Hjorth S, Carlsson A. Effects of a new type of 5-HT receptor agonist on male rat sexual behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 1981;15:785–92.
- Waldinger MD, Berendsen HH, Blok BF, Olivier B, Holstege G. Premature ejaculation and serotonergic antidepressants-induced delayed ejaculation: The involvement of the serotonergic system. *Behav Brain Res* 1998;92:111–8.
- Waldinger MD. The neurobiological approach to premature ejaculation. *J Urol* 2002;168:2359–67.
- Waldinger MD, Olivier B. Animal models of premature and retarded ejaculation. *World J Urol* 2005;23:115–8.
- van der Staay FJ, Arndt SS, Nordquist RE. Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders. *Behav Brain Funct* 2009;25:5–11.
- Olivier B, Chan JS, Pattij T, de Jong TR, Oosting RS, Veening JG, Waldinger MD. Psychopharmacology of male rat sexual behavior: Modeling human sexual dysfunctions? *Int J Impot Res* 2006;18:S14–23.
- Pattij T, Olivier B, Waldinger MD. Animal models of ejaculatory behavior. *Curr Pharm Des* 2005;11:4069–77.
- Willner P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)* 1984;83:1–16.
- van der Staay FJ. Animal models of behavioral dysfunctions: Basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. *Brain Res Rev* 2006;52:131–59.
- de Jong TR, Pattij T, Veening JG, Dederen PJ, Waldinger MD, Cools AR, Olivier B. Citalopram combined with WAY 100635 inhibits ejaculation and ejaculation-related Fos immunoreactivity. *Eur J Pharmacol* 2005;509:49–59.
- Mos J, Mollet I, Tolboom JT, Waldinger MD, Olivier B. A comparison of the effects of different serotonin reuptake blockers on sexual behaviour of the male rat. *Eur Neuropsychopharmacol* 1999;9:123–35.
- Waldinger MD, van De Plas A, Pattij T, van Oorschot R, Coolen LM, Veening JG, Olivier B. The selective serotonin re-uptake inhibitors fluvoxamine and paroxetine differ in sexual inhibitory effects after chronic treatment. *Psychopharmacology (Berl)* 2002;160:283–9.
- Clément P, Laurin M, Compagnie S, Facchinetti P, Bernabé J, Alexandre L, Giuliano F. Effect of dapoxetine on ejaculatory performance and related brain neuronal activity in rapid ejaculator rats. *J Sex Med* 2012;9:2562–73.
- Mirone V, Arcaniolo D, Rivas D, Bull S, Aquilina JW, Verze P. Results from a Prospective observational study of men with premature ejaculation treated with dapoxetine or alternative care: The PAUSE Study. *Eur Urol* 2013;13:46–54.
- Ferreira-Nuño A, Morales-Otal A, Paredes RG, Velázquez-Moctezuma J. Sexual behavior of female rats in a multiple-partner preference test. *Horm Behav* 2005;47:290–6.
- Larsson K. Features of the neuroendocrine regulation of masculine sexual behavior. In: Beyer C, ed. *Endocrine control of sexual behavior*. 1st edition. New York: Raven Press; 1979:77–163.
- Ferreira-Nuño A, Overstreet DH, Morales-Otal A, Velázquez-Moctezuma J. Masculine sexual behavior features in the Flinders sensitive and resistant line rats. *Behav Brain Res* 2002;128:113–9.
- Fernández-Guasti A, Rodríguez-Manzo G. Pharmacological and physiological aspects of sexual exhaustion in male rats. *Scand J Psychol* 2003;44:257–63.
- Ferreira-Nuño A, Fernández-Soto C, Olayo-Lortia J, Ramirez-Carretero R, Paredes RG, Velázquez-Moctezuma J, Morales-Otal A. Copulatory pattern of male rats in a multiple partner choice arena. *J Sex Med* 2010;7:3845–56.
- Waldinger MD, Zwinderman AH, Olivier B, Schweitzer DH. Proposal for a definition of lifelong premature ejaculation based on epidemiological stopwatch data. *J Sex Med* 2005;2:498–507.
- Barfield RJ, Sachs BD. Sexual behaviour: Stimulation by painful electrical shock to skin in male rats. *Science* 1968;161:392–3.
- Caggiola A, Vlahoulis M. Modifications in the copulatory performance of male rats produced by repeated peripheral shock. *Behav Biol* 1974;11:269–74.
- Sachs B, Barfield R. Copulatory behavior of male rats given intermittent electric shocks: Theoretical implications. *J Comp Physiol Psychol* 1974;86:607–15.
- van der Staay FJ, Arndt SS, Nordquist RE. The standardization-generalization dilemma: A way out. *Genes Brain Behav* 2010;9:849–55.

- 32 McCarty E, Dinsmore W. Dapoxetine: An evidence-based review of its effectiveness in treatment of premature ejaculation. *Core Evid* 2012;7:1–14.
- 33 Safarinejad MR. Once-daily high-dose pindolol for paroxetine-refractory premature ejaculation: A double-blind, placebo-controlled and randomized study. *J Clin Psychopharmacol* 2008;28:39–44.
- 34 Chan JS, Snoeren EM, Cuppen E, Waldinger MD, Olivier B, Oosting RS. The serotonin transporter plays an important role in male sexual behavior: A study in serotonin transporter knockout rats. *J Sex Med* 2011;8:97–108.