



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO  
NACIONAL

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA  
SEDE SUR

**Cambios en la transmisión glutamatérgica del ATV inducidos  
por los endocannabinoides liberados durante la cópula hasta  
la saciedad**

TESIS

Que presenta

**M.C. ESTEFANÍA GONZÁLEZ MORALES**

Para obtener el grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS**

Directora de la Tesis:

**Dra. Gabriela Rodríguez Manzo**

Ciudad de México

Enero, 2022

Esta tesis se realizó en el laboratorio 18 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) bajo la dirección de la **Dra. Gabriela Rodríguez Manzo**.

Este trabajo se realizó gracias al apoyo de beca de doctorado **No. 339464** otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**)

*A Dios por estar en mi vida y permitirme concluir este camino al que me  
permitió llegar*

*A mis padres Sara Morales Sánchez y Guillermo González Flores y a mis  
hermanos por su apoyo.*

*A mis abuelas y tíos (as) tanto paternos como maternos, por sus consejos.*

*A Abraham Román por su apoyo, cariño, paciencia y constante motivación.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Mis sinceros agradecimientos a la Dra. Gabriela Rodríguez Manzo por su apoyo, guía y consejos durante toda la maestría y el doctorado, por su gran paciencia y dedicación como tutora. Gracias por compartirme su conocimiento y experiencia en todos estos años.

A la Dra. Claudia González Espinosa por sus importantes aportaciones, particularmente para la discusión de resultados y realización de experimentos complementarios. Gracias por toda su amabilidad y total disposición siempre Dra., es usted un excelente ser humano y una excelente investigadora.

A la Doctora Silvia Lorenia Cruz Martín del Campo por sus consejos durante el desarrollo de este trabajo. Su constante interés en apoyarme a la interpretación de los resultados. Por ser tan amable conmigo.

A la Dra. Carolina López Ruvalcaba por aceptar apoyarme con la revisión de la tesis y como desde la maestría hacer valiosas aportaciones, muchas gracias Dra.

A la Doctora Nayeli Páez Martínez por sus importantes aportaciones en la discusión e interpretación de los resultados. Siempre nos hizo ver más allá del proyecto que teníamos en mente. Por ser tan amable conmigo.

Al Dr. René Garduño Gutiérrez por sus invaluables sugerencias y constante orientación para la realización de los experimentos. Por retroalimentar mi trabajo y hacerme caer en cuenta cuando podía mejorar algo y dar lo mejor de mí.

A Ángeles Ceja Gálvez por todo su valioso apoyo en la realización de los experimentos y todos los consejos laborales y personales que me brindó. Por su paciencia y amistad. Muchas gracias Ángeles.

A mis amigos con los cuales pase gratos momentos de convivencia y buenas pláticas Pablo, Mariana, Yarim, Abi, Abraham, Itzel, Jorge, Marian, Úrzula, Brenda, Francisco y Alejandra.

A mis compañeros del laboratorio René, Valeria, Nash, Pamela, Luis, Itzel y Ana por todo su apoyo, consejos y ayuda en todo momento. Sobre todo, a Val, Pamela y René de quien siempre recibí apoyo invaluable y consejos de vida.

A mis amigas que creo serán para toda la vida, Patricia e Izel, las quiero mucho.

A la Sra. Noemí Vilchis por su ayuda y consejos durante el doctorado y su valiosa, invaluable y sincera amistad.

A todas las personas que influyeron en impulsarme durante todo el doctorado que en este momento no recuerdo.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	2
<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	5
1. <i>Conducta sexual de la rata macho</i> .....	5
2. <i>Saciedad sexual</i> .....	6
3. <i>Cambios plásticos resultantes de la cópula hasta la saciedad</i> .....	7
4. <i>Circuito mesoaccumbens y actividad sexual</i> .....	9
5. <i>Sistema eCB y circuito mesoaccumbens</i> .....	11
6. <i>Neuroplasticidad en el circuito mesoaccumbens</i> .....	14
7. <i>Papel de ERK 1/2 y plasticidad sináptica</i> .....	18
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	20
<b>III. HIPÓTESIS</b> .....	22
<b>IV. OBJETIVOS GENERALES</b> .....	22
<b>V. OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	22
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	23
1. <i>Animales</i> .....	23
2. <i>Registro de conducta sexual</i> .....	24
3. <i>Paradigma de saciedad sexual</i> .....	24
4. <i>Hipersensibilidad a 8-OH-DPAT</i> .....	25
5. <i>Fármacos</i> .....	25
6. <i>Cirugía estereotáxica</i> .....	25
7. <i>Administración intra-ATV de fármacos</i> .....	26
8. <i>Verificación del sitio de implantación</i> .....	26
9. <i>Western blot</i> .....	26
a) <i>Obtención de tejido</i> .....	26
b) <i>Preparación de las muestras</i> .....	27
c) <i>Electroforesis y transferencia de proteínas</i> .....	27
d) <i>Detección y cuantificación de proteínas</i> .....	28
11. <i>RT-PCR de punto final</i> .....	28
a) <i>Obtención de tejido</i> .....	28
b) <i>Preparación de las muestras</i> .....	28
c) <i>Retrotranscripción</i> .....	30
d) <i>Amplificación de DNA</i> .....	30
e) <i>Electroforesis e identificación de bandas de DNA</i> .....	31
12. <i>Inmunohistoquímica</i> .....	31
a) <i>Obtención de cerebros</i> .....	31
b) <i>Procedimiento inmunohistoquímico</i> .....	31
c) <i>Determinación de receptores internalizados</i> .....	32
13. <i>Análisis estadístico</i> .....	34
14. <i>Diseño experimental</i> .....	34
Diseño 1 .....	34
Diseño 2 .....	35
<b>VII. RESULTADOS</b> .....	37

1. Efecto del bloqueo de los CB1Rs del ATV durante la cópula hasta la saciedad sobre la expresión de la inhibición sexual y la hipersensibilidad a 8-OH-DPAT de ratas sexualmente saciadas .....	37
2. Densidad de CB1Rs y expresión del ARNm del CB1R en el ATV de ratas macho sexualmente saciadas .....	38
3. Densidad de CB1Rs fosforilados en el ATV de ratas macho sexualmente saciadas .....	39
4. Internalización del CB1R en el ATV de ratas macho sexualmente saciadas .....	40
5. Densidad y composición de subunidades del AMPAR en el ATV de ratas macho que copulan hasta la saciedad .....	42
6. Densidad y composición de subunidades del NMDAR en el ATV de ratas macho que copulan hasta la saciedad .....	43
7. Expresión y fosforilación de ERK 1/2 en el ATV de ratas macho que copulan hasta la saciedad .....	44
8. Participación de los eCBs en la modulación de la densidad y composición de subunidades del AMPAR en el ATV de ratas macho .....	45
9. Participación de los eCBs en la modulación de la densidad y composición de subunidades del NMDAR en el ATV de ratas macho .....	46
10. Participación de los eCBs en la expresión y fosforilación de ERK 1/2 en el ATV de ratas macho .....	48
<b>VIII. DISCUSIÓN</b> .....	50
<i>Sección I. Papel del CB1R en la inhibición sexual e hipersensibilidad a 8-OH-DPAT en el ATV</i> .....	51
<i>Sección II. Cambios en la densidad, fosforilación, internalización y RNAm del CB1R en el ATV inducidos por la cópula hasta la saciedad</i> .....	54
<i>Sección III. Cambios en la densidad y composición de AMPAR y NMDAR en el ATV, inducidos por la cópula hasta la saciedad</i> .....	56
<i>Sección IV. Cambios en la densidad y composición de AMPAR y NMDAR en el ATV, mediados por los eCB liberados durante la cópula hasta la saciedad</i> ..	59
<i>Sección V. Cambios en la densidad de ERK 1/2 y pERK 1/2 en el ATV, mediados por los eCB liberados durante la cópula hasta la saciedad</i> .....	61
<b>VIII. CONCLUSIONES</b> .....	63
<b>X. PERSPECTIVAS</b> .....	63
<b>XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	65

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representación del patrón copulatorio de la rata macho
- Figura 2.** Vías que conforman el sistema mesoaccumbens
- Figura 3.** Síntesis y acción de los eCB a través de los CB1Rs
- Figura 4.** Activación e internalización del CB1R mediada por  $\beta$ -arrestina.
- Figura 5.** Los CB1R en el sistema mesoaccumbens
- Figura 6.** LTD mediada por la activación del CB1R
- Figura 7.** Cascada de activación de ERK 1/2
- Figura 8.** Diagrama de dispersión de los diferentes marcajes realizados en microscopio confocal
- Figura 9.** Porcentaje de ratas sexualmente saciadas que copula y que presenta la postura de cuerpo aplanado (PCA) en respuesta a la administración intra-ATV de AM251
- Figura 10.** Densidad de CB1R y expresión del ARNm para el CB1R en el ATV de ratas macho
- Figura 11.** Densidad del CB1R fosforilado (pCB1R) en el ATV de ratas macho
- Figura 12.** Fotomicrografías representativas del ATV de ratas macho sexualmente saciadas, obtenidas con microscopía confocal
- Figura 13.** Expresión de la subunidad GluA1 y de la subunidad GluA2 del AMPAR en el ATV de ratas macho
- Figura 14.** Densidad de la subunidad GluN1 de NMDAR en el ATV de ratas macho
- Figura 15.** Expresión de NMDARs del ATV que contienen la subunidad GLUN2A o la subunidad GLUN2B en el ATV de ratas macho
- Figura 16.** Densidad de ERK 1/2 y de ERK 1/2 fosforilada (pERK 1/2) en el ATV de ratas macho
- Figura 17.** Expresión de la subunidad GluA1 (A) y de la subunidad GluA2 (B) del AMPAR en el ATV de ratas que copulan en presencia o ausencia de AM251
- Figura 18.** Densidad de la subunidad GluN1 del NMDAR en el ATV de ratas que copularon que copulan en presencia o ausencia de AM251
- Figura 19.** Expresión de la subunidad GLUN2A (A) y la subunidad GLUN2B (B) de NMDARs en el ATV de ratas que copulan en presencia o ausencia de AM251
- Figura 20.** Densidad de ERK 1/2 (A) y de ERK 1/2 fosforilada (pERK 1/2) (B) en el ATV de ratas que copulan en presencia o ausencia de AM251

## RESUMEN

Las ratas macho que copulan hasta la saciedad presentan cambios fisiológicos de larga duración, que incluyen una inhibición sexual y una hipersensibilidad generalizada a fármacos. Tales cambios sugieren la participación de procesos de plasticidad cerebral en su inducción, pero se desconocen los procesos que subyacen a tales procesos. La activación constante de las neuronas dopaminérgicas (DAérgicas) del circuito mesolímbico (MSL) induce la síntesis y liberación de endocannabinoides (eCBs) en el área tegmental ventral (ATV). Los eCBs modulan la actividad de las neuronas DAérgicas del MSL a través de activar a receptores CB1 (CB1R), localizados tanto en terminales GABAérgicas como glutamatérgicas del ATV, y participan en procesos de plasticidad sináptica. Por otro lado, la transmisión glutamatérgica en el ATV participa en la activación de las neuronas DAérgicas (inducción del disparo en ráfaga) y en fenómenos de plasticidad sináptica. En este trabajo se puso a prueba la hipótesis de que durante la cópula hasta la saciedad se liberan eCB en el ATV, que activan al CB1R y modulan procesos de plasticidad sináptica que involucran a la transmisión glutamatérgica, y que probablemente subyacen a los fenómenos de inhibición sexual e hipersensibilidad a fármacos de los machos sexualmente saciados. Los resultados muestran que hay liberación de eCB en el ATV durante la cópula hasta la saciedad que participan en la inducción de los fenómenos de inhibición sexual e hipersensibilidad a fármacos de las ratas sexualmente saciadas. La densidad del CB1R en el ATV disminuyó, la proporción de CB1Rs fosforilados aumentó y no se detectaron cambios en el ARNm del CB1R en los animales que copularon en comparación con el grupo control. La internalización del CB1R en el ATV aumentó sólo en los machos sexualmente saciados. En el ATV de las ratas sexualmente saciadas, la densidad de AMPAR disminuyó, efecto que fue bloqueado por el pre-tratamiento con AM251, y la proporción de AMPAR que contienen la subunidad GluA2 aumentó. Por otro lado, hubo un aumento en la expresión de los NMDAR que contienen la subunidad GluN2B y una disminución en aquéllos que contienen la subunidad GluN2A en las ratas sexualmente saciadas, cambios que se bloquearon con el pre-tratamiento con AM251. Finalmente, la fosforilación de ERK 1/2 aumentó en el ATV de las ratas que copularon hasta la saciedad en presencia de AM251. En conjunto, estos resultados proveen evidencia de que durante la cópula hasta la saciedad se liberan eCBs en el ATV, que activan CB1Rs y producen cambios en la composición de los AMPARs y NMDARs, compatibles con una disminución en la estimulación que reciben las neuronas que los expresan. Además, el bloqueo de CB1R en el ATV induce un incremento de la fosforilación de ERK 1/2 en las ratas que copulan hasta la saciedad. Se concluye que los eCBs liberados durante la cópula intensa tienen un papel

protector contra la sobreestimulación glutamatérgica y están involucrados en la inducción de los cambios fisiológicos que caracterizan a las ratas sexualmente saciadas.

## **ABSTRACT**

Male rats copulating to satiety exhibit long-lasting physiological changes, that include a sexual inhibition and a generalized hypersensitivity to drug actions, which suggest the participation of brain plasticity processes in their induction. The constant activation of dopaminergic (DAergic) neurons of the mesolimbic circuit (MSL) induces endocannabinoid (eCB) synthesis and release in the ventral tegmental area (VTA). eCBs modulate the MSL DAergic neurons' activity through the activation of CB1 receptors (CB1R), located on both GABAergic and glutamatergic terminals at the VTA, and participate in synaptic plasticity processes. On the other hand, VTA glutamatergic transmission participates in the activation of DAergic neurons (induction of burst firing) and in synaptic plasticity phenomena. In this work, we tested the hypothesis that eCBs are released in the VTA during copulation to satiety, which activate the CB1R and modulate synaptic plasticity processes involving glutamatergic transmission, which probably underly the sexual inhibition and drug hypersensitivity phenomena of sexually exhausted males. Results showed that eCBs are released in the VTA during copulation to satiety that participate in the induction of the sexual inhibition and drug hypersensitivity phenomena of sexually satiated rats. CB1R density decreased, the proportion of phosphorylated CB1Rs increased, while no changes in CB1R mRNA were detected in the VTA of the animals that copulated when compared to the control group. CB1R internalization increased only in the VTA of sexually satiated males. In the sexually exhausted rats, VTA AMPAR density decreased, an effect that was blocked by AM251 pre-treatment and the proportion of AMPAR containing the GluA2 subunit increased. On the other hand, the expression of NMDARs containing the GluN2B subunit increased, while that of NMDARs containing the GluN2A subunit decreased in sexually satiated rats, changes that were blocked by pre-treatment with AM251. Finally, ERK 1/2 phosphorylation increased in rats that copulated to satiety in the presence of AM251. Taken together, these results provide evidence that eCBs are released in the VTA during copulation to satiety, which activate CB1Rs and produce changes in AMPA and NMDA composition that are compatible with a decrease in the stimulation received by neurons expressing them. Furthermore, blocking CB1R activation increased ERK 1/2 phosphorylation in the VTA of rats that copulated to satiety. It is concluded that the eCBs released during intense copulation seem to play a protective role against glutamatergic overstimulation and are involved in the induction

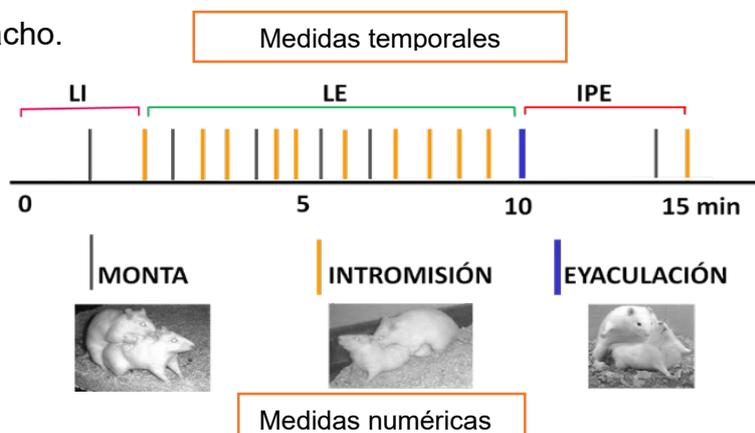
of the physiological changes that characterize sexually exhausted rats.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1. Conducta sexual de la rata macho

La conducta sexual de la rata macho está constituida por un patrón complejo de respuestas genitales y somatomotoras, suscitadas, dirigidas y mantenidas por señales internas y externas. Esto incluye tanto a las conductas precopulatorias, que permiten al macho detectar y localizar una pareja evaluando su potencial de apareamiento, como a la cópula (Hull & Rodríguez-Manzo, 2009).

El patrón copulatorio de la rata macho es estereotipado, por ello, las conductas que lo integran son fácilmente reconocibles y pueden ser cuantificadas y expresadas por su frecuencia y latencia de aparición, lo que se traduce en dos tipos de parámetros: numéricos y temporales. Los parámetros temporales incluyen: la latencia de monta (LM) y la latencia de intromisión (LI), que se refieren al tiempo que transcurre desde que el macho y la hembra entran en contacto hasta que aparece la primera monta o intromisión, respectivamente; la latencia de eyaculación (LE), que es el tiempo que transcurre desde la primera intromisión hasta que se presenta la eyaculación y el intervalo post-eyaculatorio (IPE), que es el tiempo transcurrido entre la eyaculación y el inicio de una nueva serie copulatoria, determinada por la aparición de la primera intromisión de la misma. Los parámetros numéricos incluyen el número de montas (M) y el número de intromisiones (I) que se presentan antes de la eyaculación, así como el número de eyaculaciones (E) que se presentan en el período de registro (Sachs & Meisel, 1998; Hull & Rodríguez-Manzo, 2009). En la figura 1 se esquematiza el patrón copulatorio de la rata macho.



**Figura 1.** Patrón copulatorio de la rata macho donde LI es la latencia de intromisión, LE es la latencia a la eyaculación y el IPE es el intervalo post-eyaculatorio. Modificado de Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1995a.

## 2. *Saciedad sexual*

Si se permite a una rata macho copular sin restricción con una misma hembra sexualmente receptiva, el macho presentará eyaculaciones sucesivas antes de dejar de copular y entonces se considera que está sexualmente saciado. Durante el período de cópula, las ratas macho son capaces de presentar un promedio de 7 series eyaculatorias sucesivas; sin embargo, este número puede variar entre 5 y 12 eyaculaciones, dependiendo de la capacidad eyaculatoria individual. El criterio utilizado para considerar a una rata macho sexualmente saciada es que transcurran 90 min desde la última eyaculación, sin que el animal vuelva a eyacular. Este criterio se alcanza en un período de 4 h de cópula *ad libitum*, independientemente de la capacidad eyaculatoria de cada animal (Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1994).

Veinticuatro horas después del proceso de cópula hasta la saciedad, las ratas macho se comportan de dos maneras diferentes en presencia de una hembra sexualmente receptiva: dos tercios de ellas no presentan ninguna actividad sexual y el tercio restante eyacula una sola vez, sin reanudar la actividad sexual después de esa eyaculación (Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1994). Por lo tanto, 24 h después de la cópula hasta la saciedad se pueden distinguir dos poblaciones de ratas sexualmente saciadas, una que responde limitadamente y otra que no responde a la presencia de una hembra sexualmente receptiva. Las proporciones de estas dos poblaciones se mantienen a las 48 h post-saciedad; a las 72 h post-saciedad el 65% de los animales puede eyacular una vez y reiniciar la cópula después de esa eyaculación y 96 h después de la saciedad sexual, todas las ratas son capaces de eyacular al menos una vez y reiniciar la cópula posteriormente. Sin embargo, la recuperación completa de la capacidad eyaculatoria inicial de las ratas sexualmente saciadas se observa sólo después de un período de 15 días de inactividad sexual (Beach & Jordan, 1956; Rodríguez-Manzo et al., 2011).

Con base en estas observaciones la saciedad sexual en ratas macho se define como un período de inhibición sexual de larga duración (de al menos 72 h), que aparece después de la eyaculación repetida con una misma hembra

receptiva, en el curso de una sesión de cópula *ad libitum* (Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1994; Rodríguez-Manzo et al., 2011).

### 3. Cambios plásticos resultantes de la cópula hasta la saciedad

A las 24 h post-saciedad, los machos sexualmente saciados presentan una serie de alteraciones fisiológicas adicionales a la inhibición sexual, si se les compara con ratas macho no saciadas. Por ejemplo, la estimulación eléctrica de regiones cerebrales implicadas en el control de la conducta sexual, como el área preóptica media (APOm) (Rodríguez-Manzo et al., 2000), el área tegmental ventral (ATV) (Rodríguez-Manzo & Pellicer, 2007) y el núcleo accumbens (NAcc) (Rodríguez-Manzo & Pellicer, 2010), facilita la expresión de la conducta sexual de ratas macho sexualmente expertas, pero carece de efecto en los mismos animales cuando están sexualmente saciados.

Por otro lado, un hallazgo consistente en las ratas sexualmente saciadas es que presentan una hipersensibilidad generalizada a fármacos (Rodríguez-Manzo et al., 2011). Así, por ejemplo, en machos saciados, el agonista del receptor serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub>, la 8-hidroxi-di-propilamino tetralina (8-OH-DPAT), revierte la inhibición de la conducta sexual característica de la saciedad, pero además induce la aparición de síntomas del síndrome serotoninérgico (Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1994), a dosis que no lo inducen en animales no saciados (Smith & Peroutka, 1986).

El síndrome serotoninérgico es una condición de hiperestimulación serotoninérgica descrita en animales y seres humanos (Sternbach, 1991). En 1980, Gerson y Baldessarini reportaron que los signos característicos de este síndrome en roedores incluyen temblor, rigidez, hipertonicidad, abducción de las patas traseras (hindlimb abduction), postura de cuerpo aplanado (flat body posture), rigidez y arqueamiento de cola (cola de Straub), sacudidas laterales de la cabeza (head weaving), tamborileo de las patas delanteras (forepaw treading), hiperreactividad a estímulos auditivos, mioclonías, convulsiones y respuestas autonómicas variables que incluyen salivación, erección del pene y eyaculación (Gerson & Baldessarini, 1980).

Los signos del síndrome serotoninérgico inducidos por 8-OH-DPAT pueden diferir entre especies (Curzon, 1990; Wilkinson & Dourish, 1991). En ratas, estos signos incluyen típicamente hiperlocomoción, tamborileo de las patas delanteras, movimientos ondulatorios de cabeza, postura de cuerpo

aplanado (Tricklebank et al., 1984; Dourish et al. 1985), y retracción de labio inferior (Berendsen et al. 1989), mientras que en ratones la administración de 8-OH-DPAT induce los signos de movimientos ondulatorios de la cabeza, abducción de patas traseras, tamborileo de las patas delanteras y temblor (Yamada et al., 1988). Goodwin y colaboradores definieron que el síndrome serotoninérgico está mediado por el receptor 5-HT<sub>1A</sub> post-sináptico en ratas (Goodwin et al., 1987).

Otro ejemplo de hipersensibilidad se observa con el antagonista de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, yohimbina. Este compuesto tiene efectos bifásicos sobre la cópula de ratas sexualmente expertas: la facilita a dosis bajas, pero la inhibe a dosis altas (Clark et al., 1984). En ratas sexualmente saciadas la yohimbina tiene una ventana más estrecha para sus efectos facilitadores sobre la conducta sexual, lo que se traduce en que dosis que son facilitadoras de la cópula en animales sexualmente expertos ya resulten inhibitoras en animales sexualmente saciados (Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1994). Resultados similares se observan en los efectos bifásicos de los antagonistas de receptores a opioides tipo  $\mu$  y  $\delta$ , naloxona y naltrexona, que tienen efectos inhibitorios sobre la cópula de ratas saciadas a dosis menores que las reportadas en ratas no saciadas (Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1995b). Por otro lado, el antagonista inespecífico de receptores dopaminérgicos, haloperidol, produce estereotipias (conducta de movimiento circular) en animales sexualmente saciados, a dosis que no las producen en ratas sexualmente expertas (Rodríguez-Manzo, 1999). Los fármacos usados para evaluar la hipersensibilidad a fármacos se resumen en la tabla 1.

Los fenómenos de hipersensibilidad a fármacos y de inhibición sexual de larga duración que resultan de la cópula hasta la saciedad aparecen simultáneamente a las 24 h post-saciedad, permanecen bien establecidos hasta las 72 h y disminuyen drásticamente a las 96 h post-saciedad. Es decir que la manifestación de estos fenómenos sigue un curso temporal similar, lo que sugiere que podrían representar uno o más procesos de plasticidad cerebral inducidos por la cópula intensa (Rodríguez-Manzo et al., 2011).

Entre los sistemas de neurotransmisión que participan en la inducción de la inhibición sexual y/o de la hipersensibilidad a fármacos de ratas sexualmente saciadas se ha identificado a los opioides endógenos y a los

endocannabinoides (eCBs). Ambos neurotransmisores se liberan durante la cópula y datos de nuestro laboratorio demostraron que los opioides endógenos contribuyen al establecimiento de la inhibición sexual de ratas saciadas mas no a la inducción de los fenómenos de hipersensibilidad a fármacos, mientras que los eCBs participan tanto en el establecimiento de la inhibición sexual (Canseco & Rodríguez-Manzo, 2014) como en la inducción de los fenómenos de hipersensibilidad a fármacos (González-Morales tesis de maestría, 2016). Estos antecedentes sugieren un papel importante de los eCB en la regulación de ambos fenómenos.

Tabla 1. Fármacos usados para observar la hipersensibilidad a fármacos en ratas sexualmente saciadas

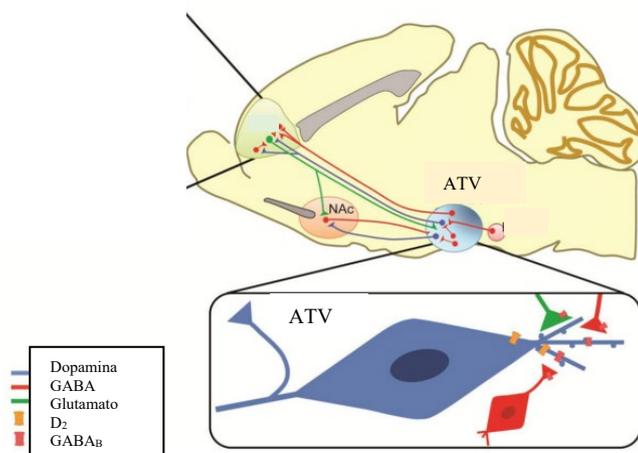
Fármacos	Evaluación de hipersensibilidad
8-OH-DPAT	Aparición de síndrome serotoninérgico
Yohimbina	Produce efectos inhibitorios sobre la cópula a dosis que todavía la facilitan en ratas sexualmente expertas
Haloperidol	Produce estereotipias (conducta de movimiento circular) en animales sexualmente saciados, a dosis que no las producen en ratas sexualmente expertas
Naltrexona y naloxona	Efectos inhibitorios sobre la cópula de ratas saciadas a dosis menores que las reportadas en ratas no saciadas

#### 4. Circuito mesoaccumbens y actividad sexual

El circuito mesoaccumbens está compuesto por neuronas dopaminérgicas que se originan en el ATV y proyectan al NAcc (Ikemoto, 2007). Este circuito está involucrado en la regulación de conductas motivadas (Kelley & Berridge, 2002) y participa en el control del componente motivacional de la conducta sexual masculina (Everitt, 1990; Guadarrama-Bazante & Rodríguez-Manzo, 2019). El circuito mesoaccumbens se activa en ratas sexualmente expertas tanto en presencia de una hembra sexualmente receptiva inaccesible, como durante la cópula, lo que da por resultado el incremento de las concentraciones de dopamina en el NAcc (Pfaus et al., 1990; Fiorino et al., 1997). Estos estímulos también inducen aumentos en la expresión de la proteína Fos (marcador de activación neuronal), tanto en el ATV como en el NAcc (Balfour et al., 2004). Por otro lado, la estimulación eléctrica tanto del ATV (Eibergen & Caggiula,

1973; Rodríguez-Manzo & Pellicer, 2007) como del NAcc (Rodríguez-Manzo & Pellicer, 2010) facilita la expresión de la cópula en ratas sexualmente expertas. Estos datos demuestran, por un lado, que el circuito mesoaccumbens regula la expresión de la cópula y, por el otro, que la cópula activa a este circuito.

Las neuronas dopaminérgicas del ATV pueden presentar dos patrones de actividad distintos: un patrón de disparo tónico, tipo marcapaso, resultante de su actividad basal, que está asociado a la liberación tónica de DA y un disparo en ráfaga, asociado a la liberación fásica de DA en el NAcc (Grace et al., 2007). En condiciones basales, las neuronas dopaminérgicas presentan un patrón de disparo tónico consistente, al que se le superpone una descarga fásica breve cuando se presenta un estímulo recompensante conocido. Las neuronas dopaminérgicas de este circuito responden de distinta forma dependiendo de la naturaleza del estímulo recompensante: presentan actividad basal si la recompensa es igual a lo esperado; responden con disparo en ráfaga si la recompensa es mejor de lo esperado y presentan una pausa en el disparo neuronal cuando la recompensa es peor a lo esperado (Pignatelli & Bonci, 2015). La actividad de las neuronas dopaminérgicas del circuito mesoaccumbens es regulada en el ATV tanto por interneuronas y aferentes GABAérgicas, que ejercen un tono inhibitorio sobre su actividad (Nair et al., 2008; Margolis et al., 2012), como por neuronas y aferentes glutamatérgicas, que se activan en respuesta a estímulos recompensantes, y las estimulan (Nair et al., 2008; Wang et al., 2015) (figura 2).

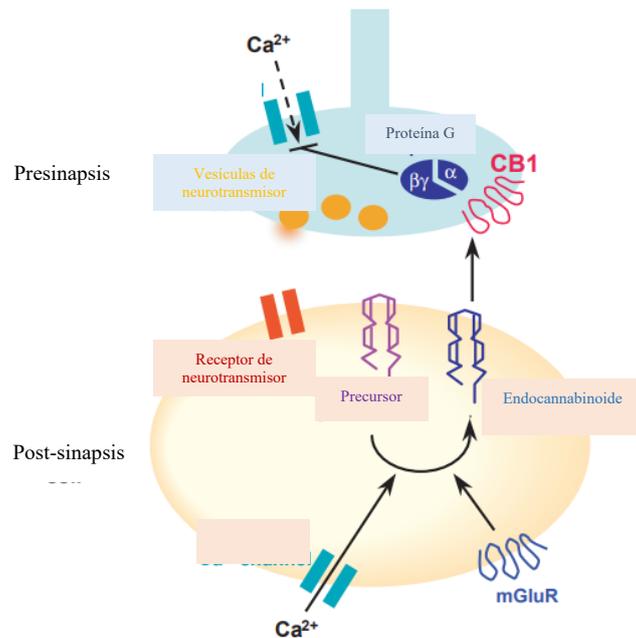


**Figura 2.** Vías que conforman el sistema mesoaccumbens, ATV (área tegmental ventral) y NAcc (núcleo accumbens). Tomado de Hearing et al., 2012.

### *5. Sistema eCB y circuito mesoaccumbens*

El sistema eCB ha sido involucrado en el control de la actividad de las neuronas dopaminérgicas del mesoaccumbens (Covey et al., 2017), así como en la regulación de motivación por conductas recompensantes naturales (Parsons & Hurd, 2015). Los eCBs son mensajeros lipídicos sintetizados y liberados a demanda, en respuesta al aumento de la actividad neuronal (Freund et al., 2003). Se producen a partir de fosfolípidos de membrana en las neuronas post-sinápticas y actúan de manera retrógrada, activando al subtipo CB1 de receptores a cannabinoides (CB1Rs) localizados en las terminales de las neuronas pre-sinápticas. Esto da como resultado la inhibición de la liberación de sus neurotransmisores (Alger, 2002; Wilson & Nicoll, 2002) (figura 3)

El sistema eCB está conformado por los endocannabinoides, de los cuales la araquidonoiletanolamida (anandamida, AEA) y el 2-araquidonoilglicerol (2-AG) son los mejor estudiados (Di Marzo et al., 1998; Mechoulam et al., 1998). El sistema también incluye los receptores a endocannabinoides CB1 y CB2 (Matsuda et al., 1990; Munro et al., 1993) y las enzimas involucradas en su síntesis y degradación. Los CB1Rs se expresan principalmente en el sistema nervioso central, mientras que los CB2Rs se han detectado principalmente a nivel periférico (Galiegue et al., 1995)

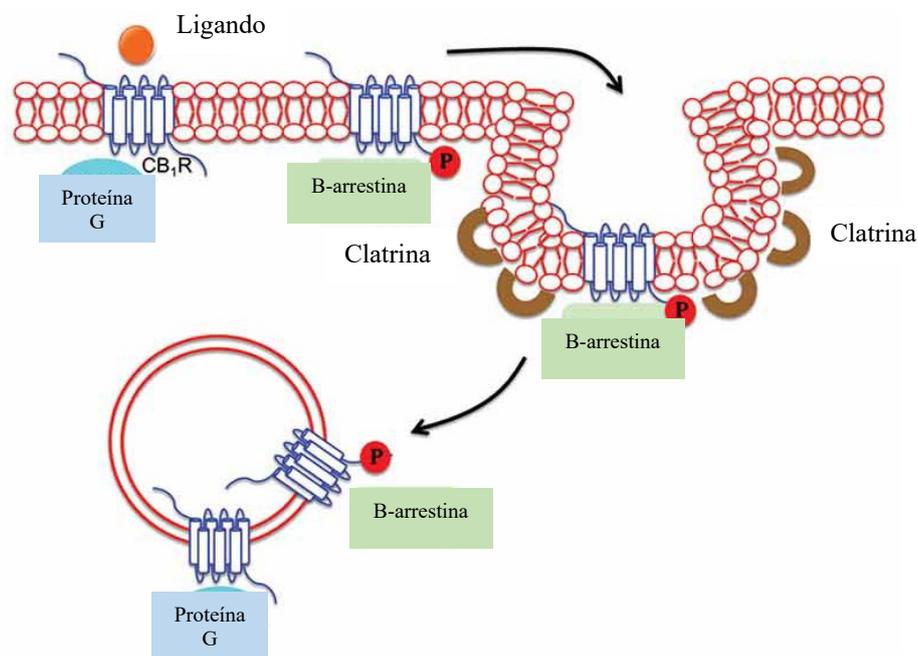


**Figura 3.** Síntesis y acción de los eCB a través de los CB1Rs sobre la liberación de neurotransmisores en una sinapsis típica. Tomado de Wilson et al., 2001

Los CB1Rs se encuentran en las terminales pre-sinápticas y, al igual que los CB2Rs, son receptores metabotrópicos acoplados a una proteína  $G_{i/o}$ . Su activación inhibe la actividad de la enzima adenilato ciclasa y con ello disminuye la concentración intracelular de AMP cíclico, inhibe canales de calcio dependientes de voltaje tipo N y P/Q (inhibiendo la entrada de calcio a la célula) y activa canales rectificadores entrantes de potasio, disminuyendo así la liberación del neurotransmisor en la terminal sináptica en que se encuentre (Al-Zoubi et al., 2019). También, se ha demostrado que los eCB pueden inducir cascadas de señalización que incluyen a las cinasas activadas por mitógeno (MAPK), como la familia de cinasas reguladas por señales extracelulares 1/2 (ERK 1/2) (Bouaboula et al., 1995).

Después de la activación del receptor CB1 por la unión del ligando, la  $\beta$ -arrestina se une al receptor fosforilado por las cinasas del receptor de la proteína G (Kendall & Yudowski, 2017). La internalización de receptores es un mecanismo que regula su disponibilidad en la membrana plasmática (Coutts et al., 2001). La mayoría de los GPCR son fosforilados primero por GRKs en la región carboxilo terminal y posteriormente se recluta a la proteína,  $\beta$ -arrestina (1/2), que interactúa con el sitio de fosforilación, produciendo el desacoplamiento de la proteína G (desensibilización) (figura 4). Las  $\beta$ -

arrestinas se han identificado como mediadores de la desensibilización e internalización de los GPCR (Ferguson, 2001; Howlett & Mukhopadhyay, 2000; Hsieh et al., 1999). Una vez internalizados, los receptores se desfosforilan y se reciclan a la membrana (resensibilización) o se degradan en lisosomas. La exposición repetida al agonista también conduce a una disminución en los niveles del receptor, fenómeno conocido como regulación a la baja causada por la degradación del receptor, disminución de su síntesis o ambas (Thibault et al., 2013).

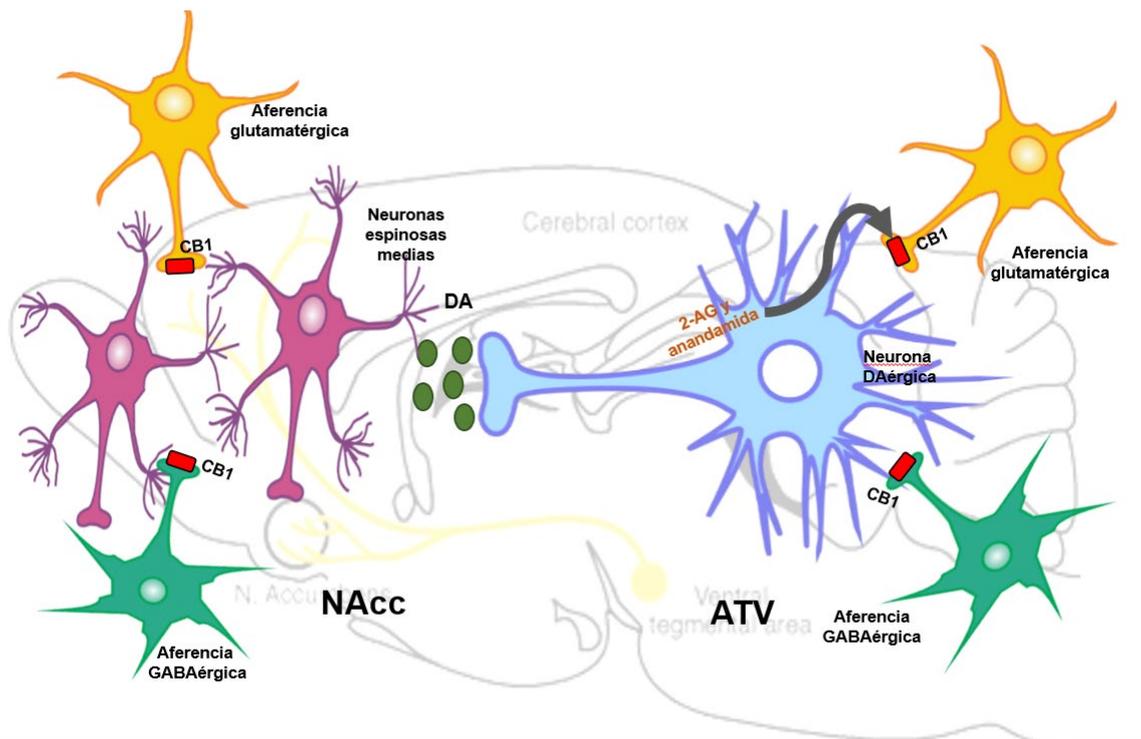


**Figura 4.** Activación e internalización del CB1R mediada por  $\beta$ -arrestina. Tomado de Kendall & Yudowski, 2017

En el circuito mesoaccumbens, los eCB se producen en los somas de las neuronas dopaminérgicas del ATV (Melis et al., 2004; Lupica & Riegel, 2005) y viajan retrógradamente activando CB1Rs localizados en las terminales de las neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas que modulan su actividad. Por otro lado, en el NAcc, los eCB se sintetizan y liberan de las neuronas espinosas medias (MSN) y viajan retrógradamente activando CB1Rs localizados en las terminales de neuronas glutamatérgicas y de interneuronas GABAérgicas (Herkenham et al., 1991; Robbe et al., 2001; Mátyás et al., 2007) (figura 5).

La actividad sexual intensa que tiene lugar durante una sesión de cópula hasta la saciedad podría inducir la síntesis y liberación de eCBs en el ATV,

debido a que las neuronas dopaminérgicas son estimuladas repetidamente. Por otro lado, se ha demostrado que el bloqueo de los CB1Rs durante la cópula hasta la saciedad previene la aparición de los fenómenos de inhibición sexual e hipersensibilidad a fármacos en ratas a las 24 h post-saciedad, lo que sugiere que hay liberación de eCBs durante la cópula repetida, que contribuyen al establecimiento de ambos fenómenos (Canseco-Alba & Rodríguez-Manzo, 2014; González-Morales, tesis de maestría).



**Figura 5.** Los CB1R en el sistema mesoaccumbens. Podemos observar que dentro del área tegmental ventral en neuronas de tipo glutamatergico y GABAérgico y el núcleo accumbens en las neuronas espinosas medias, se encuentran CB1R regulando su actividad y la liberación de neurotransmisor.

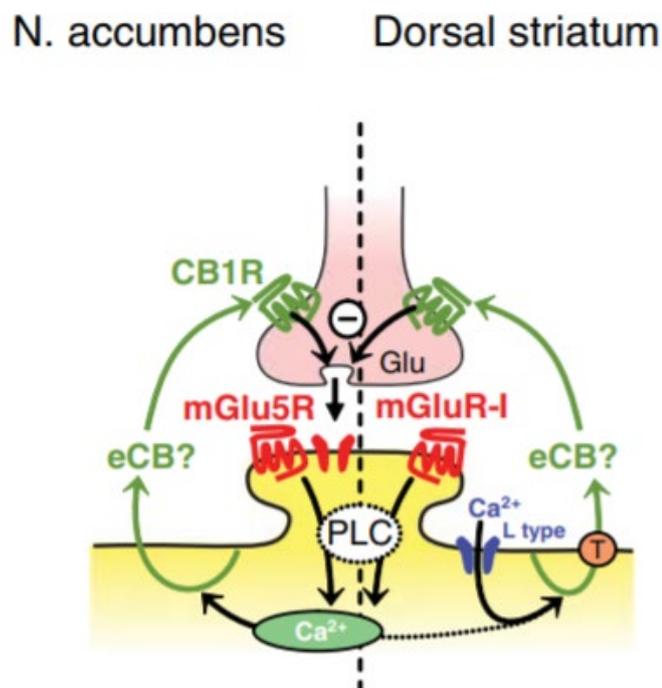
### 6. Neuroplasticidad en el circuito mesoaccumbens

La neuroplasticidad se define como la capacidad del cerebro para adaptarse al ambiente, lo que subyace a la formación de la memoria, al aprendizaje y algunas modificaciones conductuales (Barco et al, 2006). Se ha descrito que el estrés y las conductas recompensantes promueven procesos de plasticidad cerebral (McClung & Nestler, 2008).

La plasticidad sináptica es un fenómeno que ocurre tanto en sinapsis excitatorias como inhibitorias (Xu & Chen, 2015). Entre los mecanismos celulares de plasticidad neuronal que se han caracterizado están los fenómenos de potenciación a largo plazo (LTP) y depresión a corto plazo (LTD) (Malenka & Bear, 2004), que ocurren en respuesta a la estimulación repetida de una sinapsis e implican cambios de larga duración en la eficacia de la transmisión sináptica. La LTP se induce clásicamente por una breve estimulación de alta frecuencia (Holtmaat & Caroni, 2016), por el contrario, la LTD se induce por una estimulación de baja frecuencia (Nabavi et al., 2014).

De manera interesante, los endocannabinoides participan en procesos de plasticidad sináptica de corto y largo plazo, tanto en sinapsis excitatorias como inhibitorias (Kano et al., 2009; Xu et al., 2010, 2012). La activación pre-sináptica del CB1R produce dos tipos de plasticidad de corto plazo: una relacionada con la transmisión GABAérgica, denominada supresión de la inhibición inducida por despolarización (DSI), y otra relacionada con la transmisión glutamatérgica, a la que se le llama supresión de la excitación inducida por despolarización (DSE) (Wilson & Nicoll, 2002; Diana & Marty, 2004). Tanto la DSI como la DSE reducen la probabilidad de que ocurra la liberación de neurotransmisor y ambas formas de plasticidad de corto plazo se han descrito tanto en el ATV (Melis et al., 2004; Riegel & Lupica, 2004) como en el NAcc (Hoffman & Lupica, 2001; Robbe et al., 2001). Hay evidencias que sugieren que el eCB 2-AG es el que media los procesos de DSI y DSE (Pan et al., 2009; Gao et al., 2010). La activación del CB1R también induce fenómenos de plasticidad de largo plazo como LTD (Chevalleyre et al., 2006). La inducción de LTD mediada por eCB (eCB-LTD) requiere la activación de CB1R presinápticos y en la mayoría de los casos, se expresa en la pre-sinapsis como una reducción duradera de la liberación del transmisor. El eCB requerido para activar al CB1R es liberado por la célula postsináptica en respuesta a un aumento de  $Ca^{2+}$  y / o activación de los mGluR del grupo I (mGluR-I) situados en esa misma célula postsináptica (Chevalleyre et al., 2006) (figura 6). Las formas de eCB-LTD son independientes de los NMDAR postsinápticos y se ha reportado en estructuras cerebrales como el cuerpo estriado dorsal (Gerdeman et al., 2002), el núcleo accumbens (Robbe et al., 2002), la amígdala (Marsicano et al., 2002) y el hipocampo (Chevalleyre & Castillo 2003).

Por otra parte, la transmisión glutamatérgica participa en procesos de plasticidad en el circuito mesoaccumbens. El glutamato es el principal transmisor excitador del sistema nervioso central y ejerce sus acciones a través de tres familias de receptores ionotrópicos, permeables a  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ : los receptores tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), los receptores para ácido 2-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) y los receptores a kainato. Los efectos del glutamato también están mediados por receptores metabotrópicos (acoplados a proteínas G), de los cuales hay 8 subtipos que se agrupan en tres grupos: Grupo I (mGluR1 y mGluR5), grupo II (mGluR2 y mGluR3) y grupo III (mGluR4, 6-8) (Nakanishi et al., 1998).



**Figura 6.** LTD mediada por la activación del CB1R por eCB (liberados por la activación de mGluR-I e incrementos postsinápticos de calcio) en NAcc y estriado dorsal. Tomado de Chevaleyre et al., 2006

Los NMDAR son heterotetrámeros formados por distintas subunidades, cuya composición puede variar. La subunidad GluN1 es constitutiva y tiene el sitio de unión a glicina, las subunidades GluN2A-D tienen el sitio de unión a glutamato y las subunidades GluN3A/B tienen el sitio de unión de los co-agonistas glicina y d-serina. En el caso de los AMPAR, éstos son también heterotetrámeros compuestos por subunidades GLUA2, GLUA3 o GLUA4 que

pueden variar, y por la subunidad GLUA1, que es constitutiva (Hollmann & Heinemann, 1991; Yu & Lau, 2018).

En las sinapsis glutamatérgicas, la despolarización inicial de la membrana post-sináptica es mediada por AMPAR, lo que libera a los NMDAR del bloque de  $Mg^+$  que ocluye su poro y esto facilita su activación. Dicha activación inicia vías de señalización dependientes de  $Ca^{2+}$ , que inducen, entre otros efectos, a la inserción de AMPAR en la post-sinapsis, lo cual genera cambios en la fuerza sináptica que dan lugar a los fenómenos de LTP y LTD (Derkach et al., 2007; Guzmán et al., 2018). Se ha descrito que la composición de AMPAR y NMDAR determina sus propiedades biofísicas y su farmacología. Por ejemplo, los NMDAR que contienen las subunidades GluN2B/C/D muestran una baja probabilidad de apertura del canal y su desactivación es muy lenta, contrario a los NMDARs que contienen la subunidad GluN2A, que presentan una alta probabilidad de apertura del canal y una desactivación rápida (Paoletti et al., 2013, Glasgow et al., 2015).

La composición de NMDAR varía de acuerdo con su localización subcelular. En la post-sinapsis se encuentran típicamente diheterómeros GluN1/GluN2A y triheterómeros GluN1/GluN2A/GluN2B. Por otra parte, los sitios extra-sinápticos y peri-sinápticos (fuera o alrededor de la sinapsis) están enriquecidos con NMDAR que contienen la subunidad GluN2B (Hardingham & Bading, 2010; Gladding & Raymond, 2011), lo que implica que son menos activos que los de la post-sinapsis. Debido a que los NMDAR son móviles, particularmente aquellos que contienen la subunidad GluN2B, se intercambian entre sitios sinápticos y extra-sinápticos a través de difusión lateral, regulando así su número y composición en la sinapsis. Los receptores que contienen la subunidad GluN2B son más móviles que aquellos que contienen la subunidad GluN2A (Tovar & Westbrook, 2002).

Existen reportes que indican que las subunidades GLUN2A y GLUN2B de los NMDAR juegan un papel central en la plasticidad sináptica, ya que ocurren cambios en su composición en respuesta a la actividad sináptica. La subunidad GLUN2B se intercambia por la subunidad GLUN2A (Bellone & Nicoll 2007), lo que modifica la fisiología del receptor, que pasa de presentar una baja probabilidad de apertura (al contener la subunidad GLUN2B) a presentar una alta probabilidad de apertura (al contener la subunidad GLUN2A).

Los AMPARs que contienen las subunidades GluA1 y GluA2 son los más abundantes en el estriado (Stefani et al., 1998) y se ha descrito que aquellos AMPAR que contienen esas dos subunidades son impermeables a calcio (Hollmann et al., 1991; Burnashev et al., 1992) y se desensibilizan y desactivan lentamente, al contrario de los receptores que carecen de la subunidad GLUA2 (Washburn et al., 1997). Particularmente en el ATV, los receptores a glutamato tipo NMDA (Guzmán et al., 2018), tipo AMPA (Harris et al., 2004; Pina & Cunningham, 2016) y tipo mGluR5 (Ferrada et al., 2017) se encuentran localizados en los somas de las neuronas dopaminérgicas y su activación modifica su tasa de disparo (Wang et al., 2015).

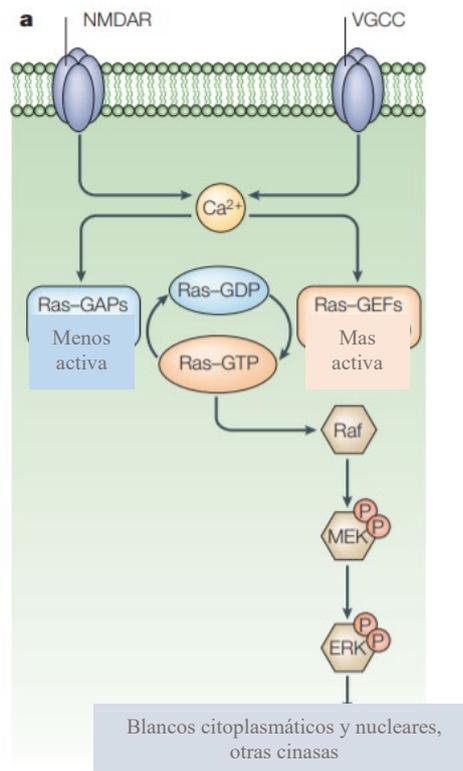
Antecedentes de nuestro laboratorio indican que los receptores glutamatérgicos tipo AMPA, NMDA y mGluR5 participan en el mantenimiento de la inhibición sexual que presentan las ratas sexualmente saciadas, puesto que la administración de antagonistas de estos receptores revierte la inhibición sexual (Rodríguez-Manzo, 2015).

### *7. Papel de ERK 1/2 y plasticidad sináptica*

Las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) fueron descubiertas como reguladores críticos de la diferenciación y división celular. La familia de las MAPK incluye a las cinasas JNKs, p38 y ERK 1/2 (Sweatt, 2001). En neuronas, la cinasa reguladora de señales extracelulares (ERK 1/2), isoformas p44 y p42 o ERK 1 y ERK 2, se activan siguiendo la siguiente secuencia: un estímulo extracelular, como la despolarización de la membrana y el consecuente aumento en el influjo de calcio al interior de la célula, produce un incremento en la forma activa de la proteína Ras (Ras-GTP); después Ras-GTP activa a la proteína cinasa Raf, la cual fosforila y activa a la enzima MEK y MEK, a su vez, fosforila a ERK 1/2 en los residuos de treonina y tirosina, en el asa de activación. Una vez activada ERK 1/2 fosforila factores de transcripción, proteínas del citoesqueleto, enzimas, etc. (figura 7) (Thomas & Huganir, 2004; Sweatt, 2004).

ERK 1/2 se encuentra expresada de manera abundante en neuronas maduras donde tiene una participación importante en los mecanismos de transducción de señales para inducir plasticidad sináptica y como integradoras de señales bioquímicas para coordinar señales extracelulares (Sweatt, 2001).

De manera específica, se ha encontrado que ERK participa en la plasticidad sináptica dependiente de experiencia en el circuito mesoaccumbens, particularmente en las formas de plasticidad de largo plazo (Lu et al., 2006; Girault, et al., 2007; Fricks & Marshall, 2011), a través de activar factores de transcripción para genes de expresión temprana. Se ha descrito que la activación de ERK 1/2 puede inducir LTP de manera dependiente o independiente de la activación del NMDAR (por ejemplo, por la activación de receptores a DA, receptores metabotrópicos a glutamato, etc.) en rebanadas de hipocampo (English & Sweatt, 1996; Wu et al., 1999; Coogan et al., 1999), debido a su papel en la regulación de genes de expresión temprana. Se ha propuesto que la activación de ERK 1/2 dependiente de NMDAR es a través de la activación de PKA o PKC (Roberson et al., 1999). Se ha descrito también que el influjo de calcio a través del AMPAR es un estímulo que induce la activación de ERK 1/2 dependiente de calcio, y ocurre por la vía PI3-K, en el hipocampo (Perkinton et al., 1999). Como se mencionó anteriormente, una vez que ERK 1/2 se activa puede actuar sobre distintos blancos, entre ellos el factor de transcripción CREB (elemento de respuesta a AMPc) y canales de potasio. Se propone que CREB regula la inducción de genes de expresión dependientes de LTP y los canales de potasio juegan un papel en la regulación del influjo de calcio necesario para la activación de las cinasas PKC y CAMKII que subyace a LTP en hipocampo (Sweatt, 2001)



**Figura 7.** Cascada de activación de ERK 1/2 dependiente del aumento en el influjo de calcio inducido por la activación del NMDAR y canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC). Tomado de Thomas & Huganir, 2004.

Se ha descrito que ERK 1/2 se activa por la administración de drogas de abuso en regiones cerebrales relacionadas con la recompensa como en el ATV (Berhow et al., 1996; Lesscher et al., 2003), el NAcc (Valjent et al., 2000; Pascoli et al., 2014), el núcleo de la base o lecho de la estría terminal, la amígdala y capas profundas de la corteza prefrontal (Valjent et al., 2004). Dicha activación participa en las adaptaciones moleculares y conductuales (plasticidad de largo plazo inducida por distintas drogas de abuso) que dependen del receptor D1, y de NMDAR y de receptores glutamatérgicos metabotrópicos del grupo I, ya que el antagonismo de esos receptores previene la activación de ERK 1/2 (Choe et al., 2002; Valjent et al., 2001, 2004, 2005). Por otra parte, se ha descrito que agonistas del CB1R activan ERK 1/2 y, que participa en la inducción de LTD en sinapsis inhibitorias (I-LTD) facilitando así la inducción de LTP en sinapsis glutamatérgicas.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A las 24 h después de una sesión de cópula hasta la saciedad, las ratas macho presentan al menos dos fenómenos de larga duración que sugieren plasticidad cerebral: inhibición de la conducta sexual y una hipersensibilidad generalizada a fármacos. La duración de ambos fenómenos sigue un curso temporal similar, por lo que parecieran ser manifestaciones de uno o más procesos de plasticidad sináptica (Rodríguez-Manzo et al., 2011).

La cópula repetida activa constantemente al circuito mesoaccumbens (Fiorino et al., 1997) y se sabe que la activación intensa de las neuronas DA de este circuito induce la síntesis y liberación de eCBs a partir de sus somas en el ATV (Alger & Kim, 2011). Los eCBs liberados activan a CB1Rs localizados en las terminales GABAérgicas y glutamatérgicas de esa región cerebral, inhibiendo la liberación de GABA y de glutamato (Lupica & Riegel, 2005; Wang & Lupica, 2014). El bloqueo de CB1Rs durante la cópula hasta la saciedad interfiere con el establecimiento de la inhibición sexual de larga duración (Canseco-Alba & Rodríguez-Manzo, 2014) y con la aparición del fenómeno de hipersensibilidad a fármacos (González-Morales, tesis de maestría). Esto sugiere que durante el desarrollo de la saciedad hay liberación de eCBs que participan en la inducción de ambos fenómenos.

Dado que tanto los eCBs como la transmisión glutamatérgica en el circuito mesoaccumbens participan en fenómenos de plasticidad neuronal, es posible que durante la cópula hasta la saciedad efectivamente se liberen eCB en el ATV que modulen a la transmisión glutamatérgica y promuevan cambios plásticos que induzcan los fenómenos de larga duración que caracterizan a las ratas sexualmente saciadas: la inhibición sexual y la hipersensibilidad a fármacos.

Por otra parte, al ser ERK 1/2 activada por una recompensa artificial como lo son las drogas de abuso y depender de la activación del CB1R o de receptores glutamatérgicos, entre otros, podríamos pensar que ERK 1/2 también sea activada por la conducta sexual, al ser ésta una conducta recompensante, y que esa activación dependa del CB1R o de receptores glutamatérgicos. Como se ha mencionado anteriormente, ERK 1/2 participa en la inducción de procesos de plasticidad y es posible que como resultado de la cópula repetida ocurran procesos de plasticidad en las ratas sexualmente saciadas.

### **III. HIPÓTESIS**

- ✓ Los fenómenos de inhibición sexual e hipersensibilidad a fármacos de ratas sexualmente saciadas son resultado de las acciones de los eCBs, liberados durante la cópula hasta la saciedad, sobre los CB1R del ATV.
- ✓ La transmisión glutamatérgica del ATV se modifica por la acción de los eCBs liberados durante la cópula hasta la saciedad, lo que contribuye a la aparición de uno o más procesos de plasticidad en las ratas sexualmente saciadas.

### **IV. OBJETIVOS GENERALES**

- ✓ Establecer si la hipersensibilidad a 8-OH-DPAT y la inhibición sexual de ratas macho sexualmente saciadas están mediadas por las acciones de los eCBs sobre los CB1Rs del ATV.
- ✓ Determinar si ocurren cambios en la transmisión glutamatérgica del ATV como resultado de la cópula hasta la saciedad y si los eCBs liberados durante la cópula hasta la saciedad participan en su inducción.

### **V. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Establecer si la administración intra-ATV del antagonista de CB1Rs, AM251, previa a la cópula hasta la saciedad, bloquea el establecimiento de los fenómenos de inhibición sexual e hipersensibilidad a 8-OH-DPAT en ratas sexualmente saciadas.
2. Evaluar posibles cambios en la densidad y el ARNm del CB1R del ATV por la cópula hasta la saciedad.
3. Determinar posibles variaciones en la fosforilación de CB1Rs en el ATV como resultado de la cópula hasta la saciedad.
4. Establecer si los CB1Rs del ATV se internalizan como resultado de la cópula hasta la saciedad.
5. Evaluar posibles cambios en la densidad y composición del AMPAR en el ATV como resultado de la cópula hasta la saciedad, y establecer si los eCBs participan en la inducción de dichos cambios.

6. Evaluar posibles cambios en la densidad y composición del NMDAR en el ATV como resultado de la cópula hasta la saciedad, y establecer si los eCBs participan en la inducción de dichos cambios.
7. Determinar la posible activación de las cinasas ERK 1/2 en el ATV como resultado de la cópula hasta la saciedad y establecer si los eCBs participan en dicha activación.

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

### *1. Animales*

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, de 300-350g de peso, sexualmente expertas y ratas hembra adultas como estímulo sexual. Los animales fueron alojados en grupos de 8 individuos, en cajas de acrílico y se mantuvieron en una habitación con temperatura (23-25 °C) y humedad (50-60 %) controladas y bajo un ciclo de luz/oscuridad invertido (12 h/12 h; la luz se encendió a las 10:00 am) y con libre acceso a agua y alimento comercial

(Marca LabDiet, PMI Nutrition International, LLC, catálogo 5008-RHI-W 32) a lo largo del experimento.

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL, Protocolo 0230-16), los cuales siguen las regulaciones establecidas en la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio NOM-062-ZOO-1999.

## 2. *Registro de conducta sexual*

Las pruebas de conducta sexual se realizaron en cilindros de acrílico, 2 h después del comienzo de la etapa oscura del ciclo y bajo iluminación con luz roja. A las ratas hembra se les indujo la receptividad sexual por la administración secuencial, por vía subcutánea, de benzoato de estradiol (13 µg/rata) seguido 20 h después de progesterona (7 mg/rata). Las hembras presentaron la receptividad sexual 4 h después de recibir la progesterona.

Los machos se sometieron a 5 sesiones independientes de conducta sexual y se seleccionaron aquellos que eyacularon en un período menor a 15 min, en al menos tres de las pruebas, considerándolos sexualmente expertos.

Durante las pruebas se introdujo un macho en un cilindro de acrílico con cama de aserrín y se le permitió un período de adaptación de 5 min, después del cual se introdujo una hembra receptiva y se registró la conducta sexual. Los parámetros de la cópula evaluados fueron los siguientes: número de montas (M), número de intromisiones (I), latencia de intromisión (LI), latencia de eyaculación (LE), intervalo post-eyaculatorio (IPE). Así mismo se determinó el porcentaje de animales por grupo que presentó las conductas de monta, intromisión, eyaculación y que reinició la cópula después de la eyaculación.

## 3. *Paradigma de saciedad sexual*

El paradigma de saciedad utilizado consistió en permitir a ratas macho sexualmente expertas copular *ad libitum* con una misma hembra sexualmente receptiva durante 4 h, tiempo en el que alcanzaron el criterio de saciedad (90 min desde la última eyaculación, sin que volvieran a eyacular). La actividad sexual en estos animales se registró nuevamente 24 h después de la cópula hasta la saciedad, durante 60 min.

#### 4. *Hipersensibilidad a 8-OH-DPAT*

La hipersensibilidad al agonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 8-OH-DPAT, se determinó por la aparición de un signo del síndrome serotoninérgico: la postura de cuerpo aplanado (PCA). La prueba se realizó en cilindros de acrílico, durante la etapa oscura del ciclo y consistió en determinar, a lo largo de un minuto, la presencia o ausencia del signo de PCA a intervalos de 5 min, durante 15 min; es decir, a los 15, 20, 25 y 30 min después de la inyección i.p. de 0.12 mg/kg de 8-OH-DPAT. Se consideró que el síntoma estuvo presente cuando un animal lo presentó en al menos 2 ocasiones durante la observación. Los datos se expresaron como porcentaje de animales en un grupo que presentó el síntoma.

#### 5. *Fármacos*

Todos los fármacos utilizados se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemical Co (Toluca, Estado de México). El benzoato de estradiol y la progesterona se disolvieron en aceite de maíz y se administraron a las hembras por vía subcutánea. La 8-OH-DPAT se administró por vía i.p., disuelta en agua bidestilada. El AM251 se disolvió en una mezcla de solución salina (0.9 %), DMSO (0.3 %) y Tween 80 para su administración i.p. y se disolvió en DMSO 0.3 % y solución salina (0.9 %) para su administración intra-ATV.

#### 6. *Cirugía estereotáxica*

Las ratas se anestesiaron con una mezcla de ketamina (90 mg/kg) y xilazina (9 mg/kg) y se montaron en un aparato estereotáxico. Después se realizó una incisión en la piel de la cabeza y se localizaron las coordenadas correspondientes al ATV [AP -5.3 mm desde bregma; L  $\pm$ 1 mm; DV -7.6 mm], de acuerdo con el atlas del cerebro de la rata (Paxinos & Watson, 2009). Posteriormente, se realizaron trépanos bilaterales en el cráneo, por los que se introdujeron las cánulas guía que alcanzaron una profundidad menor a 1 mm. Las cánulas se fijaron con la ayuda de acrílico dental y un tornillo que sirvió de anclaje. Por último, se colocaron mandriles dentro de las cánulas guía para evitar que se taparan durante el periodo de recuperación. Al finalizar la cirugía

se administró a los animales metamizol (100 mg/kg, i.p.) durante 3 días, para aliviar el dolor y la inflamación.

#### *7. Administración intra-ATV de fármacos*

A los animales se les permitió un período de recuperación post-cirugía de al menos 5 días, tiempo durante el cual fueron manipulados constantemente para poder administrar los tratamientos sin anestesia. La administración del fármaco se realizó a través de las cánulas guía por medio de cánulas de inyección, cuya longitud permitió que llegaran al ATV, conectadas por un catéter flexible a microjeringas Hamilton. Con ayuda de una bomba de infusión (KD Scientific) se administró el tratamiento en un volumen de 0.5  $\mu$ l por cada cánula, a una velocidad de 0.5  $\mu$ l/3 min. Al finalizar la administración, se dejó la cánula de inyección un minuto más antes de retirarla para asegurar que el volumen difundiera por completo.

#### *8. Verificación del sitio de implantación*

Al finalizar los experimentos conductuales los animales se perfundieron por vía intracardiaca con solución salina al 0.9 % y formaldehído al 8 %, con ayuda de una bomba de perfusión (Braintree Scientific, Inc), bajo una campana de extracción. Al finalizar este proceso se extrajeron los cerebros y se congelaron a 20 °C. Se hicieron cortes coronales de 60  $\mu$ m por medio de un crióstato (Leica CM1100) y las rebanadas se montaron en un portaobjetos que se utilizó como negativo para obtener imágenes con la ayuda de un escáner, en las que se verificó el sitio de implantación.

#### *9. Western blot*

##### *a) Obtención de tejido*

Al finalizar los experimentos conductuales se decapitó a los animales y se obtuvo el cerebro en menos de 5 min. Usando las coordenadas estereotáxicas de un atlas de cerebro de rata (Paxinos y Watson, 2009) como referencia, se obtuvieron cortes coronales de 2 mm de espesor de la región que contiene el VTA. De esos cortes, se obtuvieron “punches” bilaterales del VTA (1 mm de diámetro) de cada rata con la ayuda de un sacabocados (Fine Science Tools Inc., EE.UU.). Se combinaron las muestras de ambos hemisferios de cada rata,

se pusieron en buffer de lisis (200  $\mu$ L) [Tris HCL (50 mM), NaCl (150 mM), Igepal (1 %) y Tritón X-100 (1 %)], que contenía cócteles inhibidores de fosfatasas (Thermo Fisher, #catálogo 78428, 100X) y proteasas (Thermo Fisher, #catálogo 78430,100X), a un pH de 7.4 y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior procesamiento.

#### b) Preparación de las muestras

Las muestras de ATV se descongelaron y, manteniéndolas en frío, se sonicaron hasta que se observaron homogéneas (volumen final aproximado de 200  $\mu$ L). Posteriormente, se centrifugaron a 14000 rpm (20, 000 G) por 30 min, a 4 °C; se desechó el pellet y se conservó el sobrenadante (volumen final aproximado de 180  $\mu$ L) A continuación, se cuantificaron las proteínas en cada muestra mediante el método de Lowry modificado (DC Protein Assay Instruction Manual, BIORAD, Lowry et al., 1951; Peterson, 1979), tomando alícuotas de 1-5  $\mu$ L de BSA y 2  $\mu$ L de cada una de las muestras por cuadruplicado. Se usó albúmina de suero bovino como proteína de referencia (BSA, 1 mg/ml, Sigma, #catálogo 05470) para construir una curva estándar.

#### c) Electroforesis y transferencia de proteínas

Se calcularon los volúmenes de las muestras de ATV necesarios para cargar 25  $\mu$ g de proteína en los geles de electroforesis y se utilizó la misma cantidad de un buffer Laemmli de carga 2X (Sigma, #catálogo S3401) para dotar de densidad a la muestra y permitir que cayera al fondo del pozo. Posteriormente las muestras se hirvieron durante 5 min, a 95 °C, se colocaron en hielo y una vez frías se centrifugaron y se colocaron en los carriles del gel concentrador, junto con un marcador de peso molecular que se colocó en otro de los carriles (Page ruler, Thermofisher, #catálogo 26620). Las muestras se separaron en geles de 8 % poliacrilamida-SDS, utilizando una cámara de electroforesis marca Biorad, modelo Mini-PROTEAN 4, a 100 V, en frío, por aproximadamente 2 h utilizando un buffer de Tris-Glicina (tris base, glicina y SDS). Las proteínas del gel de electroforesis se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) durante 1 h, a 100 V y 350 mA utilizando un buffer de transferencia (tris base, glicina y metanol).

#### d) Detección y cuantificación de proteínas

Las membranas de PVDF que contenían las proteínas que se transfirieron del gel, se bloquearon con leche Biorad al 4 % (#catálogo 1706404), en TBS-T (trizma, NaCl y tween) para los anticuerpos contra el CB1R y pERK 1/2 y con leche al 2 % para el resto de los anticuerpos utilizados (GluN1, GluN2A, GluN2B, GluA1, GluA2, pCB1R y ERK 1/2), durante 2.5 h, a temperatura ambiente, para evitar el pegado inespecífico de anticuerpos primarios. Después se incubaron con el anticuerpo primario toda la noche, a 4 °C. Posteriormente se lavaron las membranas 3 veces (5-10 min) con TBS-T, en agitación y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente, por una hora y media, a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron 3 veces más con TBS-T y una vez con TBS (trizma y NaCl). Por último, se revelaron en un equipo de quimioluminiscencia (Biorad Chemidoc MP Imaging system #170-8265) utilizando un kit de quimioluminiscencia (Millipore catalogo #WBKLS0500), se escanearon y se midió la densidad óptica de las bandas de las membranas con el programa Image J versión 1.46 r. Los valores se normalizaron con los de la proteína que sirvió como control de carga ( $\beta$ -Actina). Las diluciones y los anticuerpos usados para cada determinación se muestran en la tabla 1

### 11. RT-PCR de punto final

#### a) Obtención de tejido

Al finalizar los experimentos conductuales se decapitó a los animales y se obtuvo el cerebro en menos de 5 min. Éste se colocó en hielo seco y con ayuda de un sacabocados se obtuvieron muestras del ATV que se colocaron en un tubo estéril de 1.5 ml, que contenía 1 ml de trizol (catálogo T9424). En este punto, las muestras se utilizaron en fresco o se congelaron a -80 grados para su uso posterior.

#### b) Preparación de las muestras

Las muestras se homogenizaron a temperatura ambiente, durante 5 min, con ayuda de un pistilo y contenedor de vidrio (homogenizador de tejido). Posteriormente, se agregaron 200  $\mu$ l de cloroformo, se agitó la muestra en un vortex por 3 seg y se permitió que reposara durante 15 min para que la mezcla

se separara en dos fases. Después se centrifugó por 15 min, a 14000 rpm (20, 000 G), a 4 °C, se transfirió la fase acuosa (fase superior) a un tubo estéril sin tocar la interfase y se agregó 1 µl de glucógeno (Thermo Scientific™, catálogo R0551, 20 mg/mL) se agitó vigorosamente por 2 seg y se agregaron 500 µl de isopropanol, se mezcló y dejó reposar durante 10 min, a temperatura ambiente.

**Tabla 2.** Resumen de anticuerpos utilizados para los procedimientos de Western blot

Western blot							
Proteína	Anticuerpos primarios				Anticuerpos secundarios		
	Fuente	Dilución	#Catálogo	Referencia	Fuente	Dilución	#Catálogo
CB1R	Conejo policlonal	1:1200	sc-20754	Almada et al., 2016	Burro anti conejo	1:10000	711-035-152
pCB1R	Conejo monoclonal	1:1000	ab186428				
GLUN1 (NMDAR)	Conejo policlonal	1:700	AGC-001	Atkin et al., 2015			
GLUN2A (NMDAR)	Conejo policlonal	1:700	AGC-002	Atkin et al., 2015			
GLUN2B (NMDAR)	Ratón monoclonal	1:1000	sc-365597	Lai et al., 2019	Cabra anti ratón	1:10000	115-035-003
GluA1 (AMPA)	Conejo policlonal	1:600	AGC-004	Lin et al., 2011	Burro anti conejo	1:10000	711-035-152
GluA2 (AMPA)	Ratón monoclonal	1:500	sc-517265	Scherma et al., 2020	Cabra anti ratón	1:10000	115-035-003
ERK1/2	Ratón monoclonal	1:1000	sc-514302	Jeong et al., 2019			
pERK1/2 (Thr202/Tyr204)	Conejo policlonal	1:1000	9101	Travaglia et al., 2016	Burro anti conejo	1:10000	711-035-152
β-Actina	Ratón monoclonal	1:1000	sc-47778	Xu et al., 2020	Cabra anti ratón	1:10000	115.035-003

A continuación, la muestra se centrifugó durante 10 min, a 14000 rpm (22, 000 G), a 4 °C. Se decantó y el pellet obtenido se lavó con 1 ml de etanol frío al 75 % y nuevamente se centrifugó durante 10 min, a 14000 rpm, a 4 °C. En seguida, se decantó y permitió secar al pellet durante 5-10 min, posteriormente éste se disolvió en 200 µl de una solución protectora de la degradación del

ARN, durante 10 min, a 60 °C. Finalmente, se tomaron 2 µl de esta solución para determinar la cantidad de ARN en µg con ayuda de un espectrofotómetro (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific) a 260 nm. El blanco o control de la medición fue la solución protectora de ARN (ARN secure) en la que se disolvió el ARN experimental. Las muestras de ARN se congelaron a -80 °C para su uso posterior.

#### c) Retrotranscripción

El kit de retrotranscripción se descongeló, centrifugó y mezcló levemente manteniéndolo en hielo. En un tubo de 0.6 ml se añadieron entre 100 ng y 5 µg de ARN que se aforaron a 12 µl con agua DEPC (libre de RNAsas). Se mezcló suavemente y centrifugó por 5 seg, se incubó a 65 °C, por 5 min, y se agregó cada reactivo del kit en el siguiente orden:

4 µl de 5X Reaction buffer

1 µl de Ribolock (inhibidor de RNAasa)

2 µl de 10 mM dNTP mix

1 µl de Revertaid H minus

Se obtuvo un volumen final de 20 µl, que se mezcló suavemente, se centrifugó 5 seg y se incubó a 42 °C, por 60 min, y después a 70 °C, por 10 min. Finalmente se añadieron 130 µl de agua DEPC para obtener un volumen final de 150 µl. El producto final se usó para PCR o se almacenó a -80 °C

#### d) Amplificación de DNA

El kit de PCR se descongeló, mezcló y centrifugó durante 5 seg. A un tubo Eppendorf estéril de 0.2 ml se añadió 1 µl de primers (10 mM por cada muestra). Estos primers fueron específicos para la detección del ARNm del CB1R o de la β-Actina. Se agregaron los siguientes reactivos en el orden indicado:

2.5 µl de 10X PCR buffer con MgCl

0.5 µl de 10 mM dNTP mix

0.2 µl de Taq polimerasa (5 µl/µl)

17.0 µl de agua DEPC

3.7 µl del producto obtenido en la retrotranscripción (templado)

Los tubos se colocaron en un termociclador durante 32 ciclos

#### e) Electroforesis e identificación de bandas de DNA

Los productos de PCR que salieron del termociclador se cargaron en un gel de agarosa (con bromuro de etidio al 0.001%), junto con el marcador de longitud de DNA y se permitió que las muestras corrieran en una cámara de electroforesis horizontal marca Bechmann, durante 1 h, a 100 V en buffer TBE 1X (Tris, ácido bórico y EDTA). Posteriormente el gel se reveló en un equipo de quimioluminiscencia (Biorad Chemidoc MP Imaging system #170-8265) en el que con la lámpara de luz UV, se detectaron las bandas que representan el DNA que se amplificó durante la PCR.

### 12. *Inmunohistoquímica*

#### a) Obtención de cerebros

24 h después de los experimentos conductuales, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (200 mg/kg vía i.p.) y se perfundieron, por vía intracardiaca por goteo, primero con 250 ml de solución de cloruro de sodio (NaCl) al 0.9 % y posteriormente con 400 ml de paraformaldehído al 4 %, en una solución amortiguadora (buffer de fosfatos de sodio 0.1 M), suplementada con 0.9 % de cloruro de sodio, a un pH de 7.3. Al finalizar este procedimiento los cerebros se extrajeron del cráneo y se colocaron en una solución de sacarosa al 30 %, en buffer de fosfatos de sodio (PBS 1X) y se almacenaron a 4 °C hasta su uso posterior.

#### b) Procedimiento inmunohistoquímico

Se realizaron cortes coronales (40  $\mu$ m) de los cerebros en la región que comprende el ATV, anterioridades de -5.00 a -6.3 con relación a bregma (Paxinos & Watson, 2009), por medio de un crióstato (Leica CM1100), a -20 °C. Los cortes se colocaron secuencialmente en una placa de 24 pozos estéril, y se lavaron 4 veces por 10 min con PBS 1X. Posteriormente se incubaron durante 2.5 h, a temperatura ambiente, en una solución de bloqueo [2.0 % albúmina sérica bovina (BSA, Sigma), 6.0 % suero de burro (Sigma), 2.0 % gelatina de pescado y 0.3% de tritón X-100 (Sigma) en PBS1X]. Las incubaciones se realizaron bajo agitación suave y constante. Una vez transcurrido este tiempo, los cortes se incubaron durante 2 h, a temperatura ambiente, después por 19 h,

a 4 °C y por último 2 h más, a temperatura ambiente, con los anticuerpos primarios CB1R,  $\beta$ -A2 y V-GLUT2 en la misma solución usada para bloquear (en los controles se omitió el primer anticuerpo lo que da por resultado la ausencia de inmunorreactividad). Una vez terminada esta incubación, los cortes se lavaron 4 veces (cada lavado por 10 min) con 400  $\mu$ l de una solución de lavado, con 2.0 % de gelatina y 0.3 % de tritón X-100 en PBS 1X. Posteriormente se incubaron con los conjuntos de anticuerpos secundarios y 1  $\mu$ l de DAPI (Sigma) en la misma solución de bloqueo descrita anteriormente, a temperatura ambiente, por 2 h. Los cortes se lavaron 4 veces (cada lavado por 10 min) con 400  $\mu$ l de una solución de lavado de 0.1 % de tritón X-100 en PBS 1X, se montaron en portaobjetos gelatinizados con un medio de montaje fotoprotector (Prolong Diamond antifade kit with DAPI, Molecular Probes, cat. P36962) y se analizaron en un microscopio confocal (Zeiss LSM 800 Airyscan).

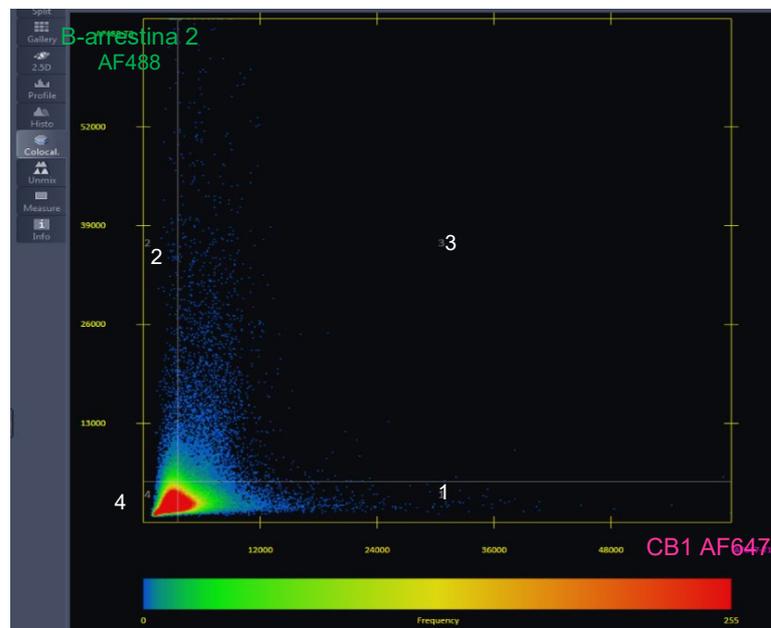
**Tabla 3.** Resumen de anticuerpos utilizados para los procedimientos de inmunohistoquímica

Inmunohistoquímica							
	Anticuerpos primarios				Anticuerpos secundarios		
Proteína	Fuente	Dilución	#Catálogo	Proteína	Fuente	Dilución	#Catálogo
CB1R	Conejo policlonal	1:75	sc-20754	Hayn et al., 2008	Burro anti conejo, Alexa 647	1:175	A31573
$\beta$ -arrestina 2	Cabra policlonal	1:75	sc-6387	Garduño-Gutiérrez et al., 2013	Burro anti cabra, Alexa 488	1:250	A11055
V-Glut2	Ratón monoclonal	1:330	MAB5504	Zhang et al., 2015	Burro y anti ratón, Alexa 555	1:300	A31750

### c) Determinación de receptores internalizados

Se utilizaron diez secciones coronales de cada cerebro, representativas de todo el ATV, tomadas de tres animales de cada grupo para la inmunodetección del CB1R y de la  $\beta$ -A2. La región correspondiente al ATV en estas secciones se localizó con el objetivo 10x, posteriormente se cambió al objetivo 40x para la adquisición de las imágenes. Las imágenes se adquirieron con el modo “best

signal” a 1 AU (airy unit) y el área óptica total para el objetivo de 40x fue de 24,336  $\mu\text{m}^2$ . El espectro máximo de emisión de cada fluoróforo se delimitó con filtros de barrera, para evitar la interferencia entre las curvas de emisión espectral. El láser de 450 nm se utilizó para detectar DAPI, el láser de 488 nm para detectar Alexa 488, el láser de 555 nm para detectar Alexa 555 y el láser de 647 nm para detectar Alexa 647. El color final de cada fluoróforo (anticuerpos secundarios) en las imágenes se seleccionó del software: magenta para Alexa 647 (CB1R), rojo para Alexa 555 (VGLUT2) y verde para Alexa 488 ( $\beta$ -A2). Se utilizó la co-localización de CB1Rs con la proteína  $\beta$ -A2 como indicador de su internalización. Los datos se obtuvieron del diagrama de dispersión como el que se muestra en la figura 8.



**Figura 8.** Diagrama de dispersión donde se observa en el eje de las X (1) la inmunorreactividad para el CB1R (Alexa flúor 647), en el eje de las Y (2) la inmunorreactividad para la proteína  $\beta$ -A2 (Alexa flúor 488). La zona 3 indica el área de co-localización CB1R- $\beta$ -A2 y la zona 4 el área de no co-localización.

Una vez obtenidos los valores de las áreas del diagrama de dispersión con ayuda del software del microscopio [se utilizó el software black ZEN v10.0 para la adquisición de imágenes y el software blue ZEN 2.3 para el procesamiento de imágenes (co-localización)] se realizaron los siguientes cálculos:

- a) Para determinar la expresión de cada una de las proteínas se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{IR Proteína} = \frac{\text{Área de proteína (1 ó 2)} (\mu\text{m}^2) + \text{Área 3} (\mu\text{m}^2)}{\text{Área total analizada} (\mu\text{m}^2)}$$

- b) Para determinar la co-localización de las proteínas se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Co-localización CB1R}/\beta\text{-A2} = \frac{\text{Área 3}}{\text{Área 3} + \text{Área 1}}$$

### 13. Análisis estadístico

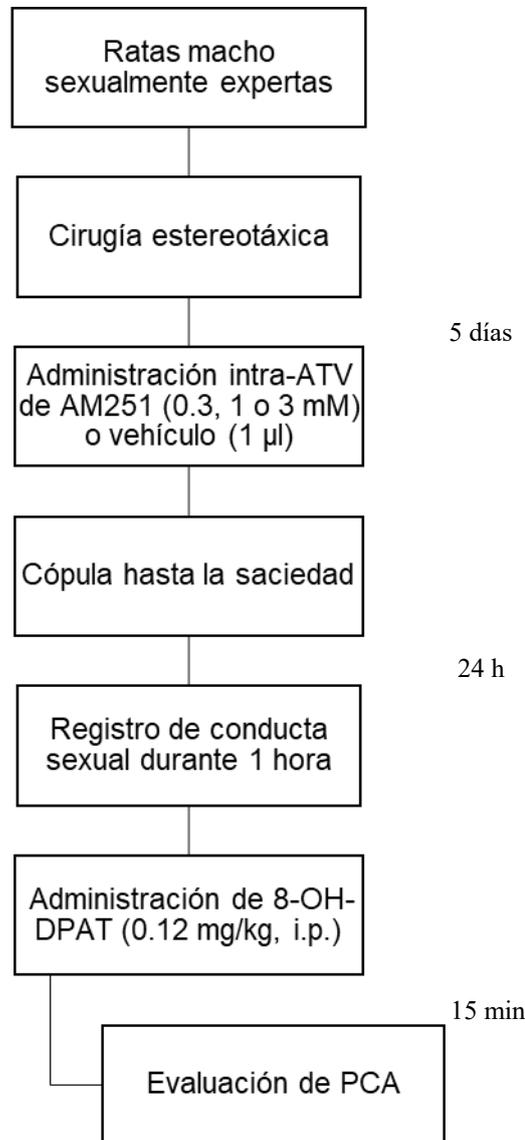
Los porcentajes de animales sexualmente saciados que presentaron el signo de PCA, la conducta de monta, la conducta de intromisión, la conducta de eyaculación y que reiniciaron la cópula después de la eyaculación, se analizaron por medio de la *F* de Fisher. Las diferencias en densidad óptica relativa (O.D.) en los experimentos de WB se analizaron con un ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey y con la prueba *t* de Student no pareada en las comparaciones entre el grupo control y un grupo experimental. Cuando los datos no cumplían con la normalidad, se utilizó la prueba *U* de Mann-Whitney. Los datos de inmunohistoquímica se analizaron mediante el ANOVA de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Dunn. Para la cuantificación de O.D. se empleó el software ImageJ y para los análisis estadísticos los programas Sigma Plot, versión 12.0 y GraphPad Prisma 7. En todos los casos se consideraron significativas las diferencias con una  $P \leq 0,05$ .

### 14. Diseño experimental

#### Diseño 1

Con el objeto de establecer si el bloqueo de la inhibición sexual y de la hipersensibilidad a 8-OH-DPAT por la administración del antagonista del CB1R, AM251, tenía lugar en el ATV se utilizaron 4 grupos independientes de ratas sexualmente expertas, implantadas bilateralmente en el ATV, a las que se les administraron diferentes concentraciones de AM251 (0.3, 1 y 3 mM) o su vehículo (1 ml/kg), inmediatamente antes de someterlas al proceso de cópula hasta la saciedad. A las 24 h post-saciedad, se registró su actividad sexual

espontánea durante 60 min; posteriormente se les administró 8-OH-DPAT (0.12 mg/kg), por vía i.p., y después de una latencia de 15 min se registró la aparición de la postura de cuerpo aplanado (PCA) durante 15 min (ver diagrama 1).



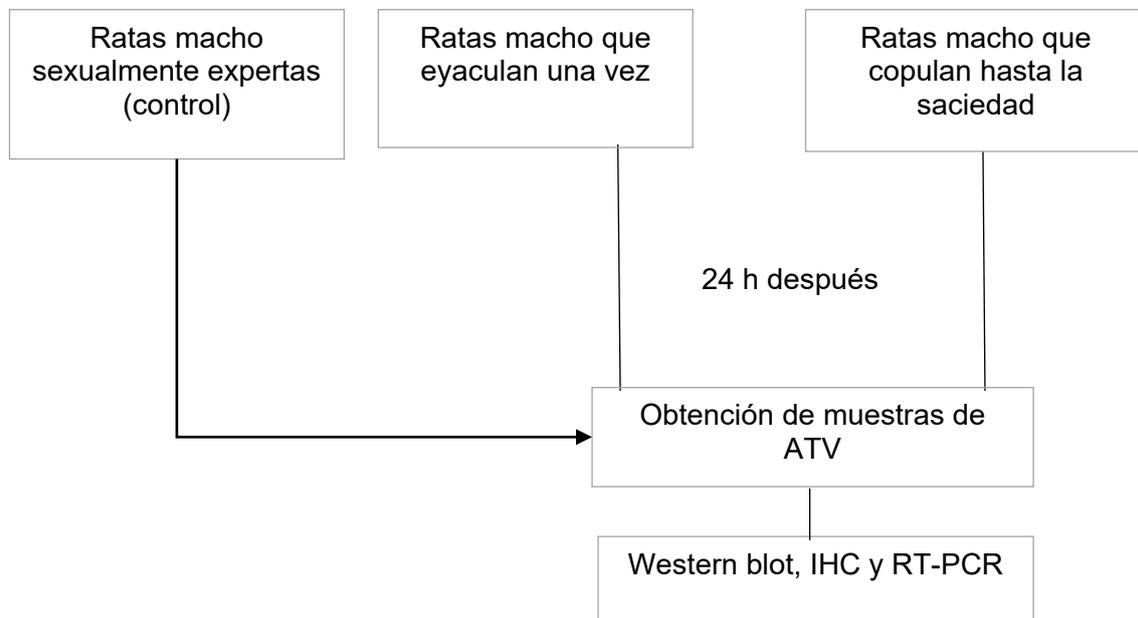
**Diagrama 1.** Diseño experimental para la determinación de la participación del ATV en los efectos de los eCBs sobre la conducta sexual y la inducción de la expresión de postura de cuerpo aplanado (PCA) en respuesta a 8-OH-DPAT.

#### Diseño 2

Se utilizaron tres grupos diferentes de machos para establecer posibles cambios en la densidad, fosforilación e internalización del CB1R, así como en la expresión del ARNm de este receptor: 1) machos con experiencia sexual que no tuvieron actividad sexual una semana antes del sacrificio, que sirvieron

como grupo control (n=3-5); 2) machos con experiencia sexual que eyacularon una vez y fueron sacrificados 24 h después, que se utilizaron como referencia para los efectos de la actividad sexual reciente (n=3-5) y 3) machos con experiencia sexual que copularon hasta la saciedad y fueron sacrificados 24 h después, que constituyen el grupo de interés (n=3-5). Los cambios en la densidad y en la fosforilación del CB1R se establecieron por medio de la técnica de Western blot, la internalización del CB1R se estableció por inmunohistoquímica y microscopía confocal y los cambios en la expresión del ARNm del CB1R por medio de PCR de punto final (diagrama 2).

Para la determinación de cambios en la densidad y composición de AMPAR y NMDAR, así como en la expresión y fosforilación de la MAPK ERK 1/2, se utilizaron los mismos 3 grupos y, con el objeto de establecer la posible participación de eCBs en los cambios en estas proteínas en los machos sexualmente saciados, se agregó un grupo de machos sexualmente experimentados que copularon hasta la saciedad en presencia del antagonista de CB1Rs, AM251, y que fue sacrificado 24 h después, (n=3-5). Estas determinaciones se hicieron con la técnica de Western blot.

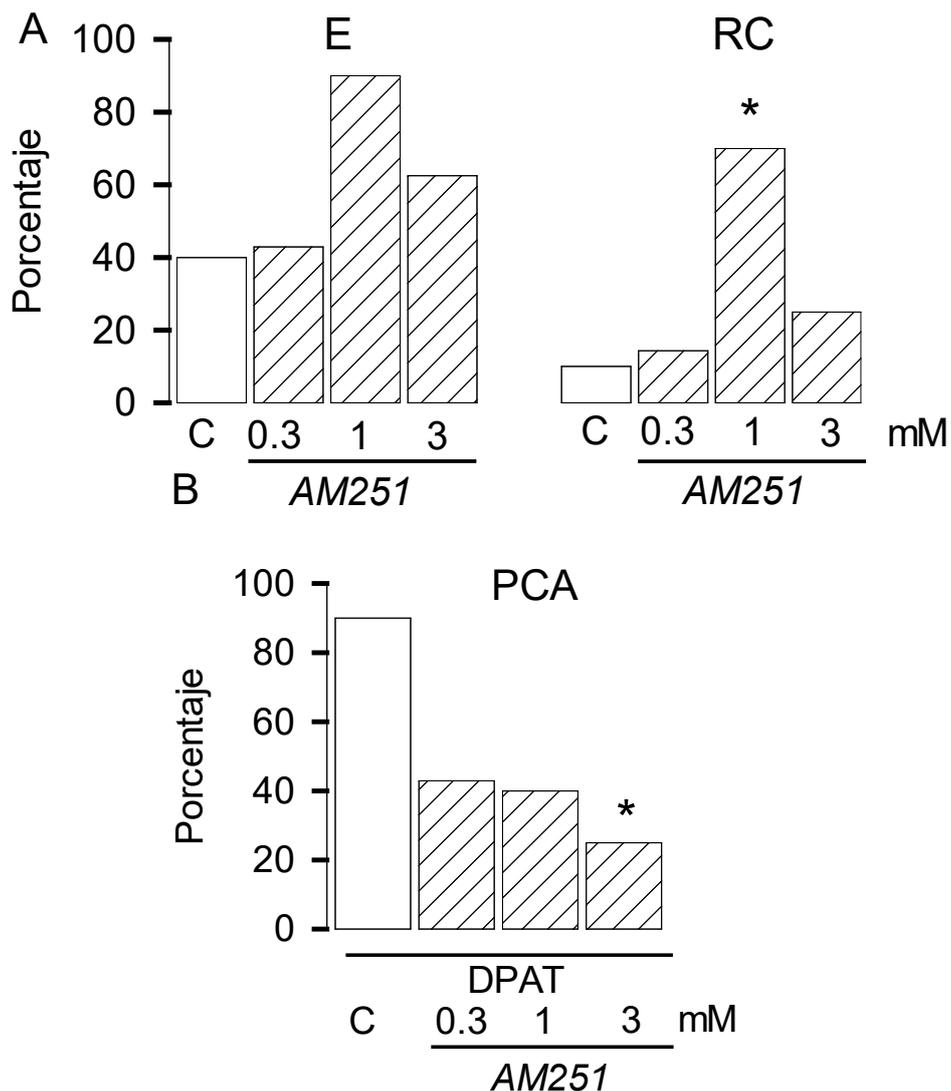


**Diagrama 2.** Diseño experimental para la determinación de los cambios en la densidad de CB1R, su fosforilación e internalización, así como el RNAm del CB1R

## VII. RESULTADOS

### 1. *Efecto del bloqueo de los CB1Rs del ATV durante la cópula hasta la saciedad sobre la expresión de la inhibición sexual y la hipersensibilidad a 8-OH-DPAT de ratas sexualmente saciadas*

La figura 9 muestra que en los animales sexualmente saciados que fueron pre-tratados con 1  $\mu$ L de AM251(1 Mm) por vía intra-ATV, la proporción de machos que eyacula y reinicia la cópula después de la eyaculación a las 24 h post-saciedad fue mayor en comparación con el grupo control. La diferencia fue estadísticamente significativa en el porcentaje de animales que reinició la cópula después de la eyaculación ( $F$  de Fisher,  $p < 0.05$ ). En cuanto a la aparición de la PCA, el pre-tratamiento con AM251 disminuyó (pero es distinto de un animal no saciado porque sigue habiendo hipersensibilidad) la proporción de animales sexualmente saciados que presentó este signo del síndrome serotoninérgico. La reducción fue estadísticamente significativa en aquellos animales pre-tratados con 3 mM de AM251 ( $F$  de Fisher,  $P < 0.05$ ).

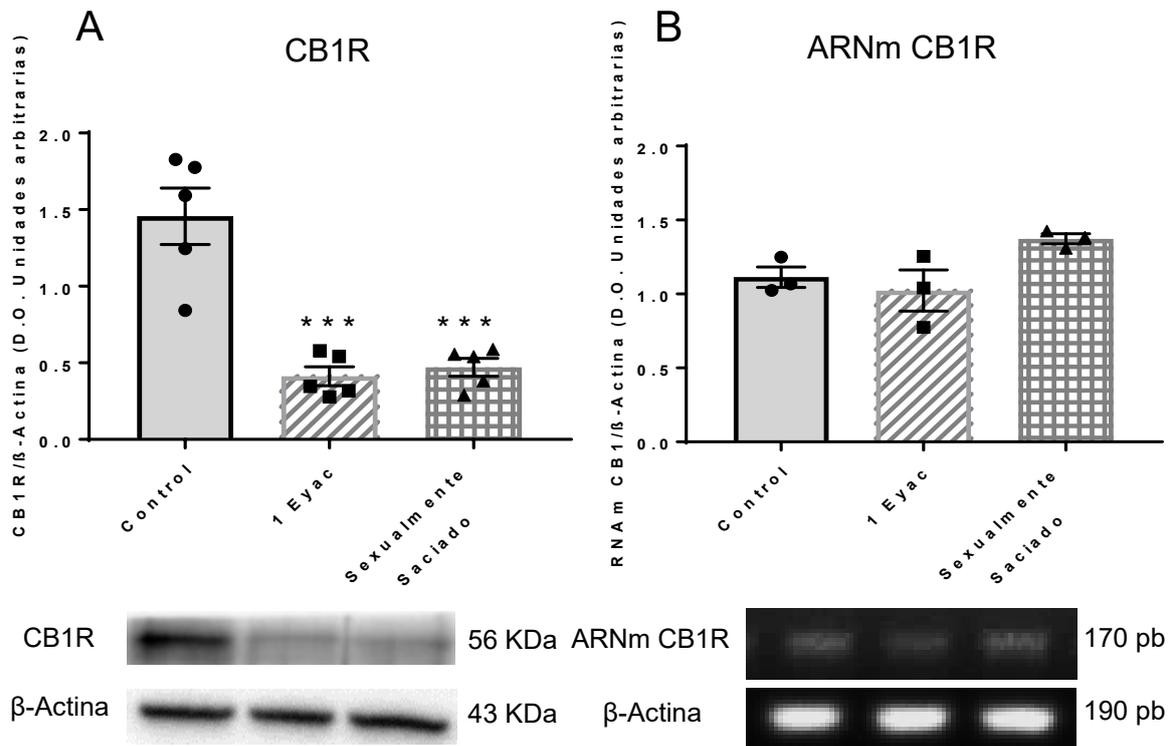


**Figura 9.** Porcentaje de ratas sexualmente saciadas que copula (A) y que presenta la postura de cuerpo aplanado (PCA) (B), en respuesta a 8-OH-DPAT (0.12 mg/kg, i.p.), 24 h después de copular hasta la saciedad en presencia de diferentes concentraciones de AM251 (0.3-3 mM) o de su vehículo (1 µl), administrado por vía intra-ATV (n= 8-11, cada uno). \*P<0.05, F de Fisher. E= eyacuación, RC= reinicio de cópula.

## 2. Densidad de CB1Rs y expresión del ARNm del CB1R en el ATV de ratas macho sexualmente saciadas

En la figura 10 se muestra que la densidad del CB1R en el ATV se modificó por la actividad sexual (A) (ANOVA de una vía,  $F_{(2,12)}=25.20$ ,  $P<0.01$ ). La densidad del CB1R disminuyó de manera significativa en los dos grupos de ratas que tuvieron actividad sexual previa al sacrificio, independientemente de si eyacularon una vez (1 Eyac) o copularon hasta la saciedad (sexualmente

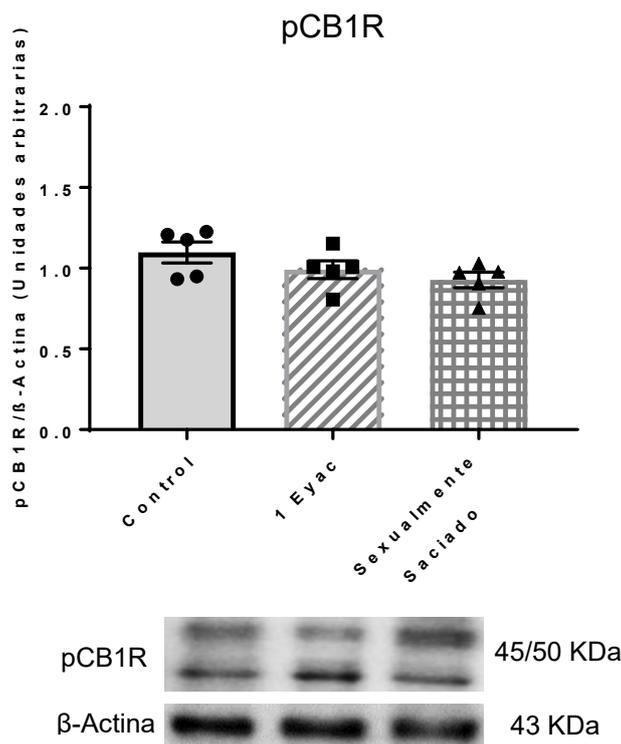
saciado) (prueba de Tukey, \*\*\*P= 0.001 para cada uno). Por otra parte, no hubo diferencias en la expresión del ARNm del CB1R entre los distintos grupos de ratas (ANOVA de una vía,  $F_{(2,6)}=3.926$ ,  $P=0.081$ ); sin embargo, se observa una tendencia al aumento en el ARNm en el grupo de ratas sexualmente saciadas (B).



**Figura 10.** Cambios en la densidad de CB1R (A) y en la expresión del ARNm para el CB1R (B) en el ATV de ratas control, ratas que eyacularon una vez (1 Eyac) y ratas que copularon hasta la saciedad (Sexualmente Saciado) 24 h antes (n=5 y n=3, respectivamente). \*\*\*P<0.001, ANOVA de una vía seguido de Tukey.

### 3. Densidad de CB1Rs fosforilados en el ATV de ratas macho sexualmente saciadas

En la figura 11 se muestra que la actividad sexual no modificó la densidad de CB1Rs fosforilados en el ATV de animales que eyacularon una vez o que copularon hasta la saciedad en comparación con el grupo control (ANOVA de una vía,  $F_{(2,12)}= 2.33$ ,  $P=0.14$ ).

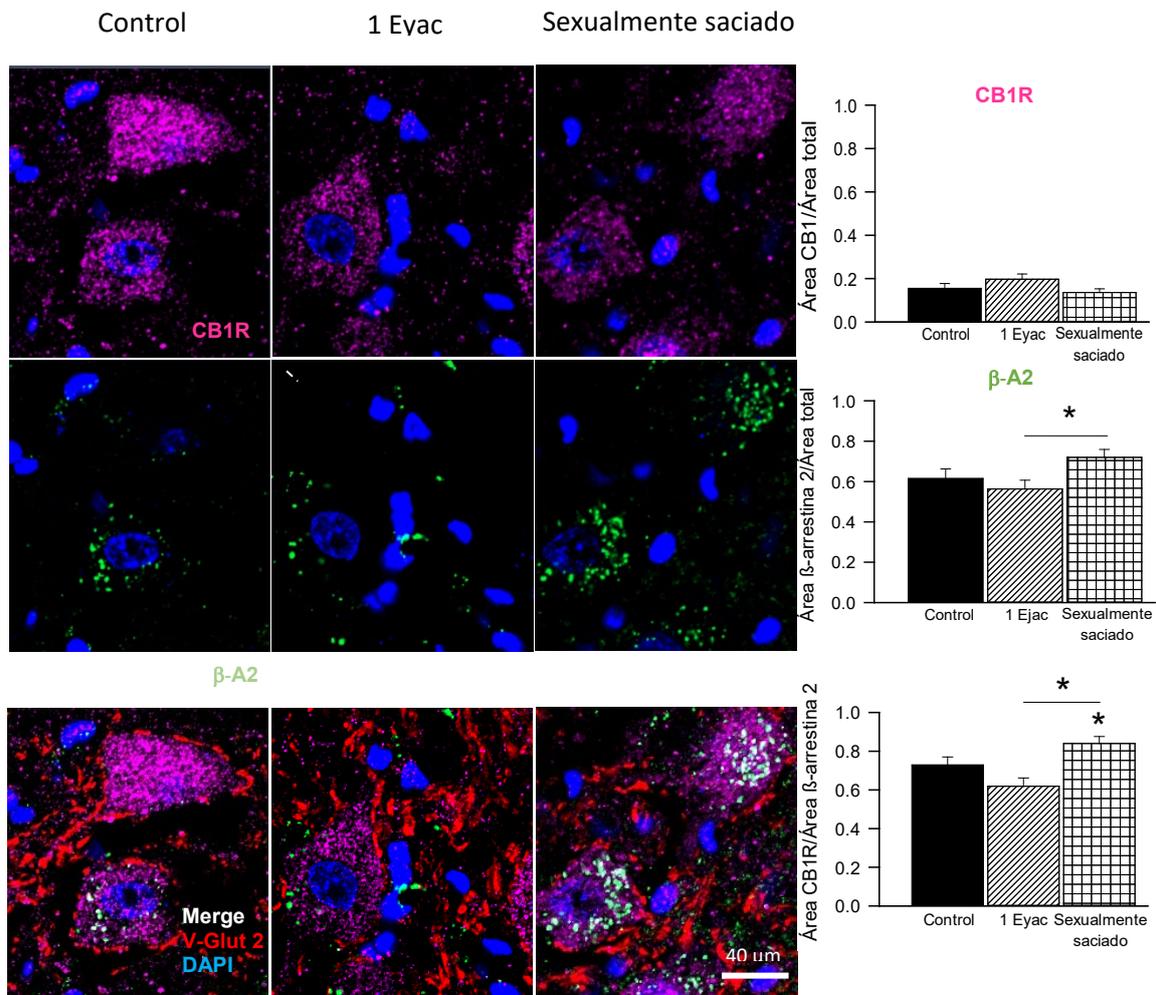


**Figura 11.** Expresión del CB1R fosforilado (pCB1R) en el ATV de ratas control, ratas que eyaculaban una vez (1 Eyac) y ratas que copularon hasta la saciedad (Sexualmente Saciado) 24 h antes (n=5, cada uno).  $F_{(2,12)} = 2.33$ ,  $P=0.14$ , ANOVA de una vía

#### 4. Internalización del CB1R en el ATV de ratas macho sexualmente saciadas

En la figura 12 se presentan los resultados del análisis inmunohistoquímico para el CB1R y la proteína  $\beta$ -A2 en el ATV de ratas control, ratas que eyaculaban 1 vez o copularon hasta la saciedad. Se puede observar que en todos los grupos el CB1R está distribuido en todo el citoplasma de las neuronas. Por otra parte, la  $\beta$ -A2 se observa en el citoplasma de neuronas en todos los grupos de ratas, pero en las ratas que copulan hasta la saciedad se observa una mayor cantidad de  $\beta$ -A2, en forma de agregados (*clusters*), en el citoplasma de las neuronas y algunos puntos que no se encuentran dentro del plano visual. La inmunorreactividad para V-Glut 2 es similar en los tres grupos de ratas y se observa distribuida alrededor de los cuerpos celulares de las neuronas, coincidiendo en algunos sitios con la membrana plasmática, pero en su mayoría parece encontrarse en fibras.

Podemos observar en los datos mostrados en la cuarta columna que no hay diferencias entre la inmunorreactividad al CB1R entre los distintos grupos de ratas (ANOVA de Kruskal-Wallis,  $H_{(2,30)} = 3.76$ ,  $P = 0.15$ ), mientras que sí hay diferencias en la inmunorreactividad de la  $\beta$ -A2 (ANOVA de Kruskal-Wallis,  $H_{(2,30)} = 6.89$ ,  $P = 0.03$ ). Se aprecia un aumento en esta marca en las ratas que copulan hasta la saciedad en comparación con ratas que eyaculan una vez (prueba de Dunn,  $P < 0.05$ ). Por otra parte, respecto de la co-localización de las marcas del CB1R y  $\beta$ -A2 en el citoplasma, también se detectan cambios (ANOVA de Kruskal-Wallis,  $H_{(2,30)} = 15.101$ ,  $P = 0.001$ ). En este caso, se observa un incremento de la co-localización de ambas marcas en ratas que copulan hasta la saciedad en comparación con ratas control y con las ratas que eyacularon una vez (prueba de Dunn,  $P < 0.05$ , cada uno).

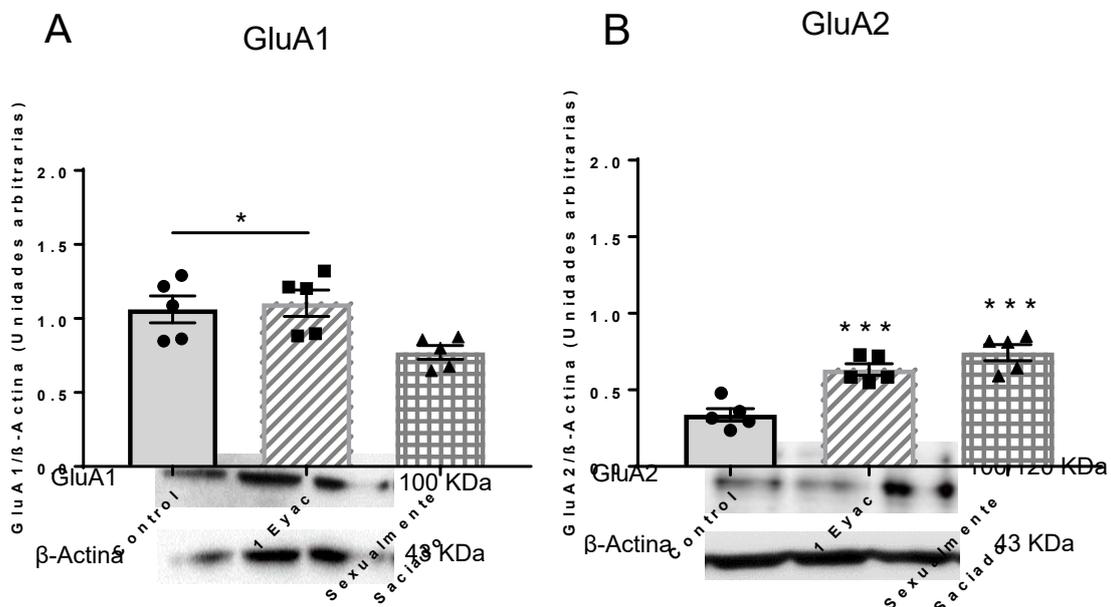


**Figura 12.** Fotomicrografías representativas obtenidas con microscopía confocal en secciones coronales del ATV de ratas control, ratas que eyacularon una vez (1 Ejac) y ratas que copularon hasta la saciedad (Sexualmente saciado) 24 h antes ( $n=3$ , cada uno). Se observa la inmunorreactividad (IR) del CB1R (magenta, Alexa 647),  $\beta$ -A2 (verde, Alexa 488), y de su co-localización (blanco), de V-Glut 2 (rojo, Alexa 555) y de

los núcleos (azul, DAPI). En las gráficas se muestra la cuantificación de la inmunorreactividad del CB1R y de la  $\beta$ -A2, así como de su co-localización. Escala: 40  $\mu$ m. \* $P < 0.05$ , ANOVA de Kruskal-Wallis seguida de prueba de Dunn.

### 5. Densidad y composición de subunidades del AMPAR en el ATV de ratas macho que copulan hasta la saciedad

En la figura 13 se observa que la densidad del AMPAR del ATV, evaluada a través de su subunidad constitutiva GluA1, disminuyó significativamente en las ratas que copularon hasta la saciedad (ANOVA de una vía,  $F_{(2,12)} = 5.33$ ,  $P = 0.02$ ) en comparación con animales que eyacularon una vez (prueba de Tukey,  $P < 0.05$ ) y estuvo muy cerca de tener significancia estadística en comparación con el grupo control (prueba de Tukey,  $P < 0.054$ ) (A). A diferencia de lo que se observó en la expresión del CB1R, aquí sí hay diferencias entre los animales de 1 eyaculación y los saciados. En el panel B, se observan cambios en la expresión de la subunidad GluA2 entre grupos (ANOVA de una vía,  $F_{(2,12)} = 22.71$ ,  $P = 0.001$ ). En este caso, hay un aumento significativo en la expresión de esta subunidad, tanto en los animales que eyacularon una vez como en los machos sexualmente saciados (prueba de Tukey,  $P < 0.001$ , para ambos), en comparación con ratas control.

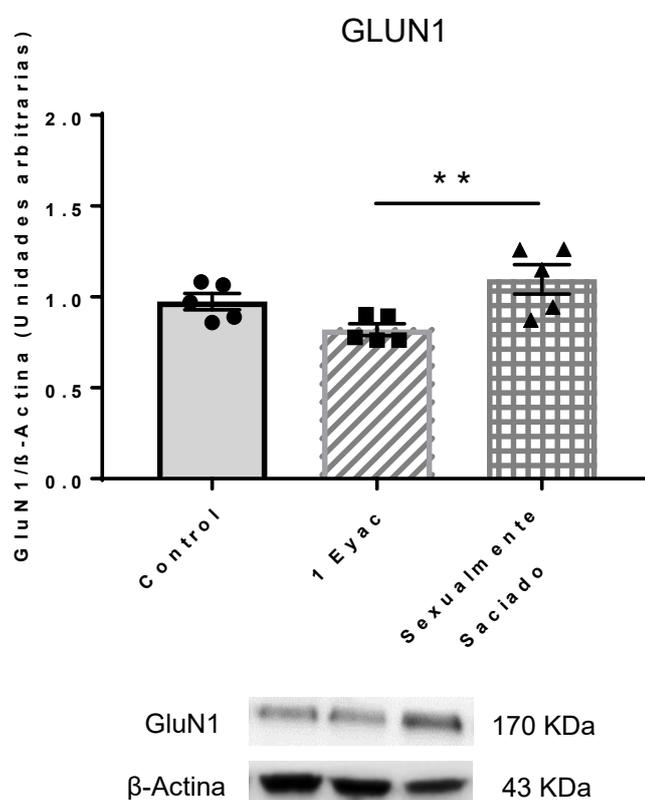


**Figura 13.** Cambios en la expresión de la subunidad GluA1 (A) y de la subunidad GluA2 (B) del AMPAR en el ATV de ratas control, ratas que eyacularon una vez (1

Eyac) y ratas que copularon hasta la saciedad (Sexualmente Saciado) 24 h antes (n=5, cada uno). \*P<0.05, \*\*\*P<0.001, ANOVA de una vía seguido de Tukey.

### 6. Densidad y composición de subunidades del NMDAR en el ATV de ratas macho que copulan hasta la saciedad

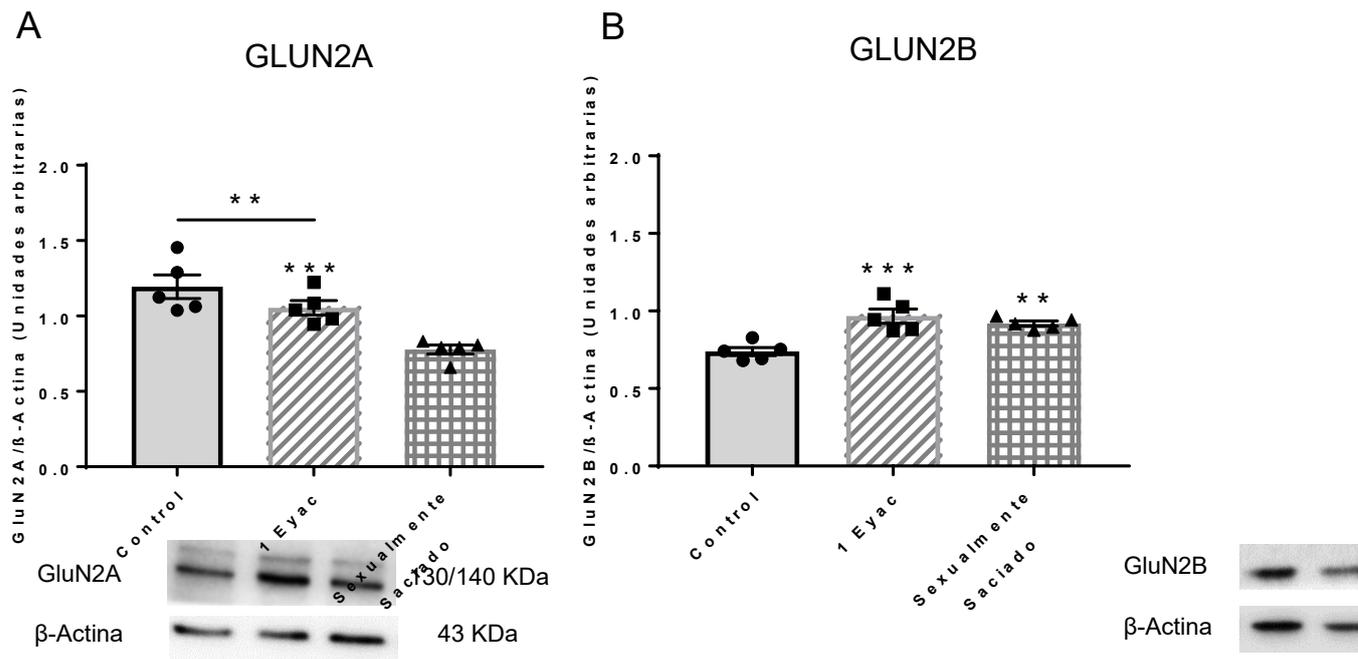
En la figura 14 se observa que la densidad del NMDAR del ATV, evaluada a través de la expresión de su subunidad constitutiva GLUN1, se modificó por la actividad sexual (ANOVA de una vía  $F_{(2,12)}=6.05$ ,  $P=0.015$ ). Se encontró un aumento significativo en la densidad de GluN1 en ratas que copularon hasta la saciedad en comparación con el grupo de ratas que eyacularon una vez (prueba de Tukey,  $P<0.01$ ), pero no en comparación con el grupo control.



**Figura 14.** Cambios en la densidad de la subunidad GluN1 del NMDAR en el ATV de ratas control, ratas que eyacularon una vez (1 Eyac) y ratas que copularon hasta la saciedad (Sexualmente Saciado) 24 h antes (n=5, cada uno). \*\*P<0.01, ANOVA de una vía seguido de Tukey.

Los cambios en la expresión de las subunidades GluN2A y GluN2B del NMDAR se muestran en la figura 15. En el panel A se observa una disminución estadísticamente significativa (ANOVA de una vía  $F_{(2,12)}=14.3$ ,  $P=0.001$ ) en la

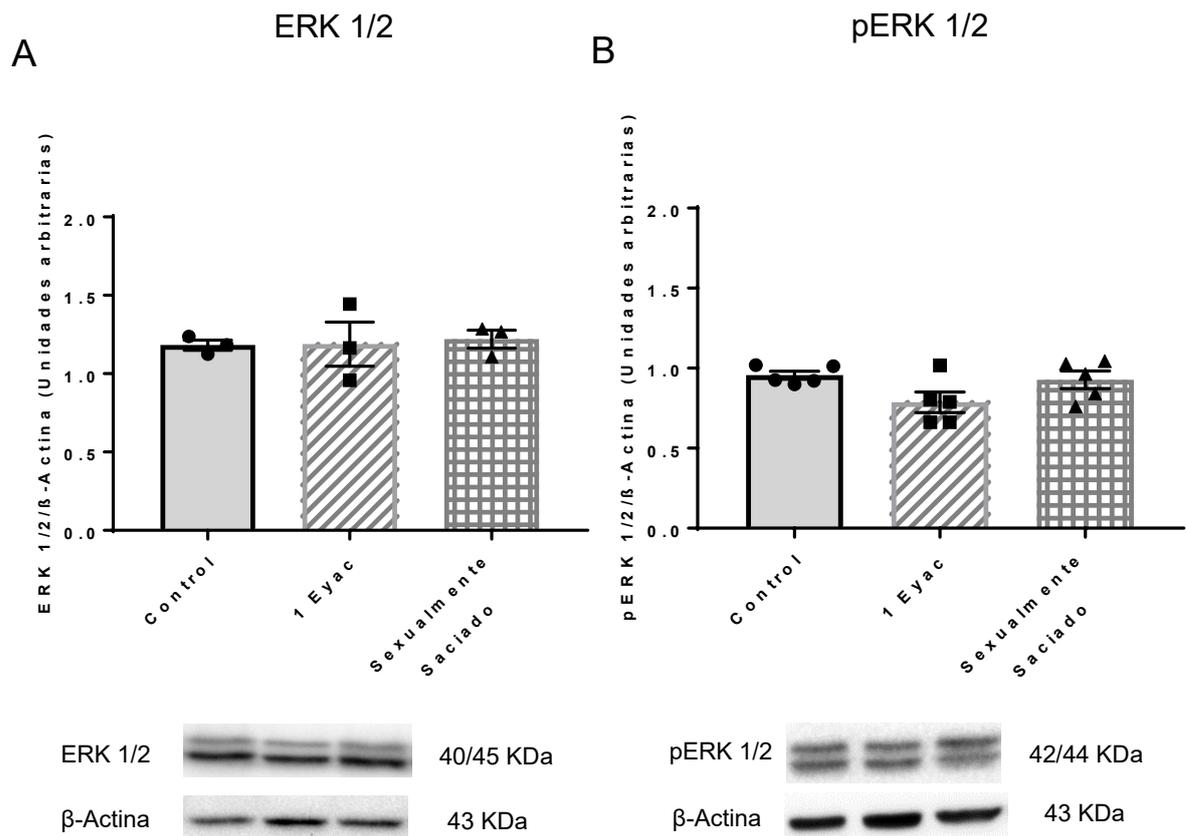
densidad de la subunidad GluN2A en el grupo de ratas que copula hasta la saciedad en comparación con el grupo control y con el grupo de animales que eyaculan una vez (prueba de Tukey,  $P < 0.001$  y  $P < 0.01$ , respectivamente). En el panel B se observa un aumento en la expresión de la subunidad GluN2B (ANOVA de una vía,  $F_{(2,12)} = 14.5$ ,  $P = 0.001$ ), tanto en las ratas que eyacularon 1 vez (prueba de Tukey,  $P < 0.001$ ) como en las que copularon hasta la saciedad (prueba de Tukey,  $P < 0.01$ ), con respecto al grupo control.



**Figura 15.** Cambios en la expresión de la subunidad GLUN2A (A) y la subunidad GLUN2B (B) de NMDARs en el ATV de ratas control, ratas que eyacularon una vez (1 Eyac) y ratas que copularon hasta la saciedad (Sexualmente Saciado) 24 h antes ( $n=5$ , cada uno).  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ , ANOVA de una vía seguido de Tukey.

### 7. Expresión y fosforilación de ERK 1/2 en el ATV de ratas macho que copulan hasta la saciedad

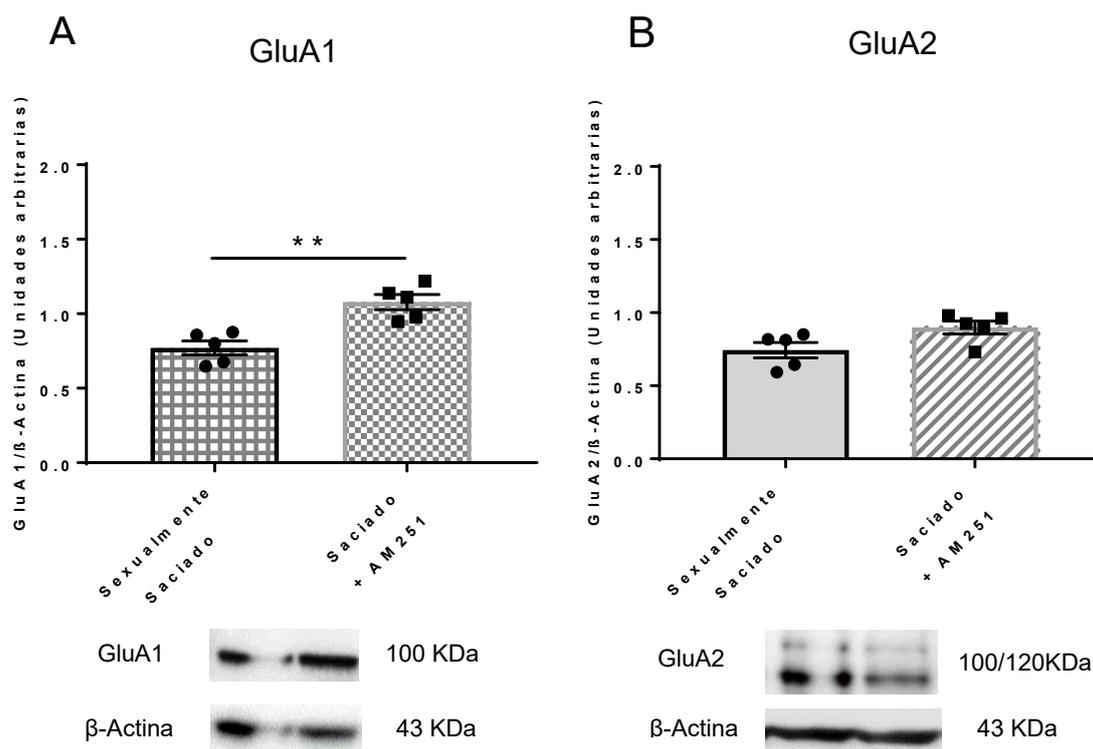
En la figura 16 (A) se muestra que no se detectan cambios en la expresión de ERK 1/2 total en el ATV de las ratas que eyaculan una vez o copulan hasta la saciedad (ANOVA de una vía  $F_{(2,6)} = 0.05$ ,  $P = 0.95$ ). En cuanto a la cantidad de ERK 1/2 fosforilada, tampoco se observaron cambios en el ATV de las ratas que tuvieron actividad sexual (ANOVA de una vía  $F_{(2,12)} = 3.12$ ,  $P = 0.08$ ), ya sea que hubieran tenido una eyaculación o hubieran copulado hasta la saciedad.



**Figura 16.** Cambios en la densidad de ERK 1/2 (A) y de ERK 1/2 fosforilada (pERK 1/2) (B) en el ATV de ratas control, ratas que eyaculaban una vez (1 Ejac) y ratas que copularon hasta la saciedad (Sexualmente Saciado) 24 h antes (n=3-5, cada uno)  $F_{(2,6)}=0.05$ ,  $P=0.95$ ,  $F_{(2,12)}=3.12$ ,  $P=0.08$ , ANOVA de una vía

#### 8. Participación de los eCBs en la modulación de la densidad y composición de subunidades del AMPAR en el ATV de ratas macho

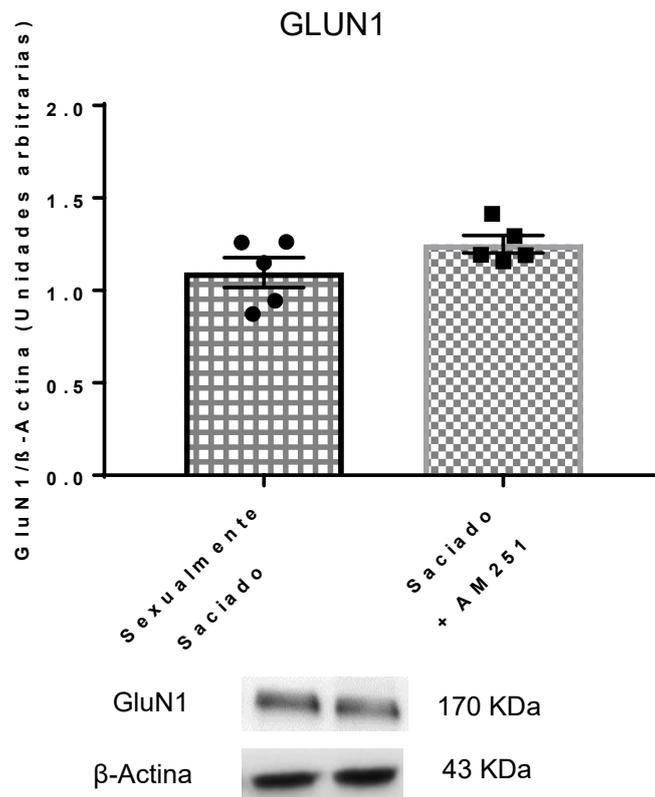
En la figura 17 se observa que la densidad del AMPAR del ATV, evaluada a través de su subunidad constitutiva GluA1 aumentó en los animales que copularon hasta la saciedad en presencia del antagonista de CB1R, AM251 en comparación con las ratas sexualmente saciadas sin tratamiento (prueba t,  $P < 0.002$ ). En el panel B, no se observan cambios en la expresión de la subunidad GluA2 en los machos que copularon hasta la saciedad en presencia del AM251.



**Figura 17.** Cambios en la expresión de la subunidad GluA1 (A) y de la subunidad GluA2 (B) del AMPAR en el ATV de ratas que copularon hasta la saciedad (Sexualmente Saciado) y ratas que copularon hasta la saciedad en presencia de AM251 (Saciado + AM251) 24 h antes (n=5, cada uno). \*\*P<0.01, Prueba de t.

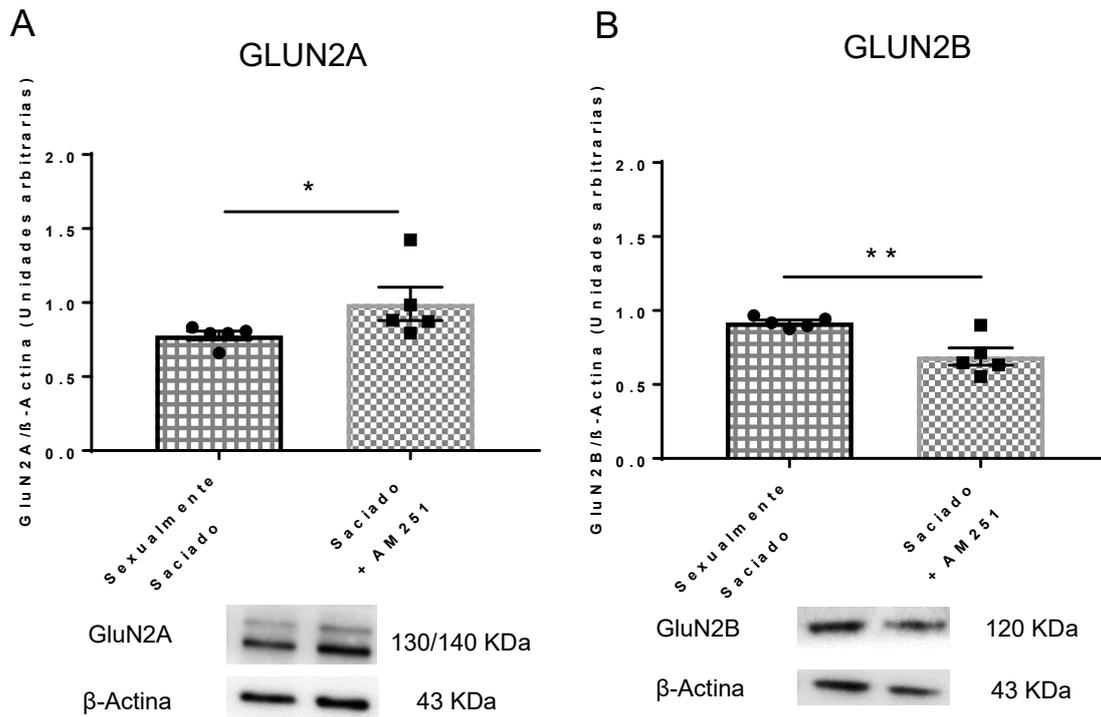
### 9. Participación de los eCBs en la modulación de la densidad y composición de subunidades del NMDAR en el ATV de ratas macho

En la figura 18 se observa que la densidad del NMDAR del ATV no se modificó en las ratas que copularon hasta la saciedad en presencia de AM251 en comparación con ratas saciadas que copularon en ausencia de AM251.



**Figura 18.** Cambios en la densidad de la subunidad GluN1 del NMDAR en el ATV de ratas que copularon hasta la saciedad (Sexualmente Saciado) y ratas que copularon hasta la saciedad en presencia de AM251 (Saciado + AM251) 24 h antes (n=5, cada uno).  $t = -1.634$ ,  $P = 0.07$ , Prueba de t

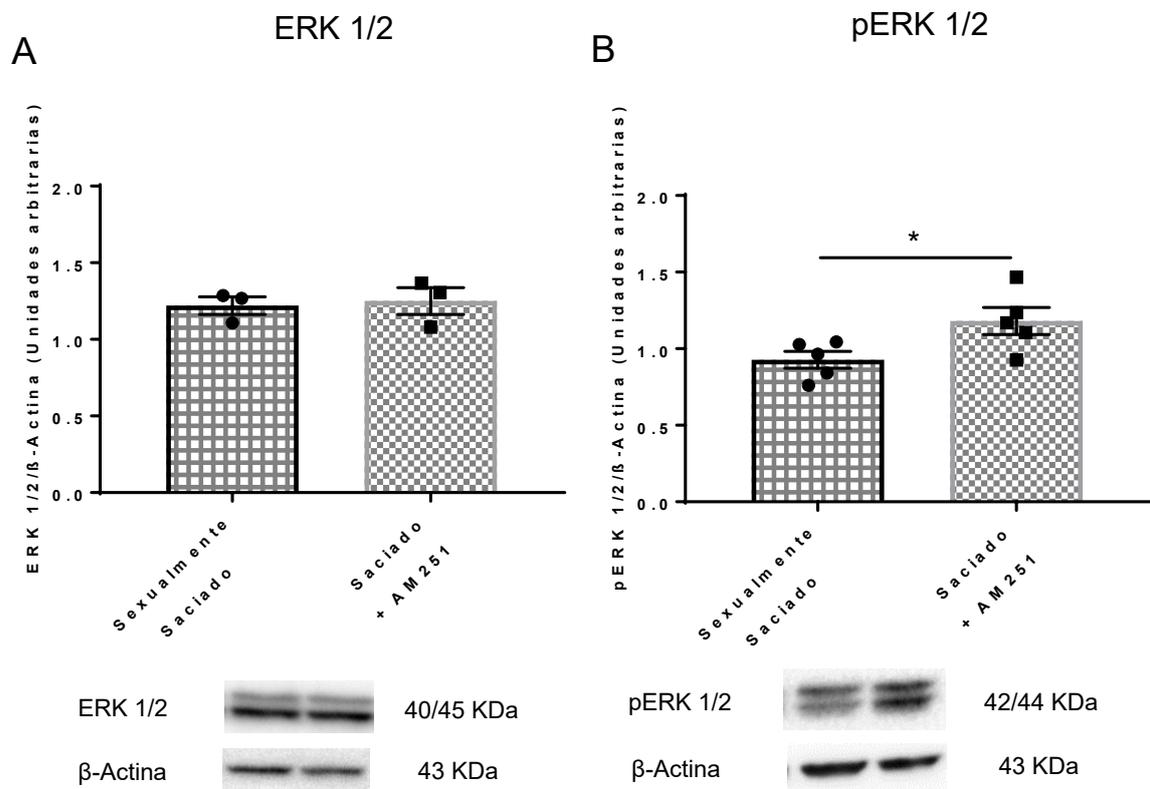
En la figura 19, en el panel A, se observa que el pre-tratamiento con AM251 a ratas que copulan hasta la saciedad bloqueó la disminución de la expresión de la subunidad GluN2A (U de Mann–Whitney,  $P = 0.03$ ). En el panel B, el pre-tratamiento con AM251 en ratas que copularon hasta la saciedad, previno el incremento en la expresión de la subunidad GLUN2B que se observa en ratas saciadas (prueba de t,  $P < 0.01$ ).



**Figura 19.** Cambios en la expresión de la subunidad GLUN2A (A) y la subunidad GLUN2B (B) de NMDARs en el ATV de ratas que copularon hasta la saciedad (Sexualmente Saciado) y ratas que copularon hasta la saciedad en presencia de AM251 (Saciado + AM251) 24 h antes (n=5, cada uno) \* P<0.05, \*\*P<0.01, Prueba de t.

#### 10. Participación de los eCBs en la expresión y fosforilación de ERK 1/2 en el ATV de ratas macho

En la figura 20 (A) se muestra que no se detectan cambios en la expresión de ERK 1/2 total en el ATV de las ratas que copulan hasta la saciedad con respecto a los animales que copularon hasta la saciedad en presencia de AM251 (prueba de t,  $t = -0.29$ ,  $P = 0.393$ ). En cuanto a la densidad de ERK 1/2 fosforilada, se observa un aumento en la fosforilación de ERK 1/2 en el ATV de las ratas que copularon hasta la saciedad en presencia de AM251 en comparación con las que lo hicieron sin tratamiento (prueba de t,  $P < 0.05$ ).



**Figura 20.** Cambios en la densidad de ERK 1/2 (A) y de ERK 1/2 fosforilada (pERK 1/2) (B) en el ATV de ratas que copularon hasta la saciedad (Sexualmente Saciado) y ratas que copularon hasta la saciedad en presencia de AM251 (Saciado + AM251) 24 h antes (n=3-5, cada uno). \*P<0.05, Prueba de t.

## VIII. DISCUSIÓN

Los principales hallazgos de esta investigación se pueden resumir de la siguiente manera:

- a) el bloqueo de CB1Rs en el ATV durante la cópula hasta la saciedad, interfirió con la aparición de los fenómenos de inhibición sexual e hipersensibilidad a fármacos que presentan las ratas sexualmente saciadas
- b) la cópula, tanto una eyaculación como hasta la saciedad, indujo una disminución en la densidad de CB1Rs del ATV, sin producir cambios en la expresión de los CB1Rs fosforilados, ni en la expresión del ARNm para el CB1R
- c) en las ratas que copularon hasta la saciedad hubo un aumento en la internalización del CB1R en neuronas del ATV
- d) la cópula hasta la saciedad produjo una disminución de la densidad de AMPAR en el ATV, que se previno cuando los animales copularon en presencia de un antagonista de CB1Rs
- e) la expresión de AMPAR que contienen la subunidad GLUA2 aumentó en el ATV de las ratas sexualmente saciadas y dicho aumento permaneció en las ratas que copularon hasta la saciedad en presencia del antagonista del CB1R
- f) la densidad de NMDAR aumentó en las ratas que copularon hasta la saciedad, cambio que fue independiente de la activación de CBR1
- g) en las ratas sexualmente saciadas la densidad de los NMDAR que contienen la subunidad GLUN2A disminuyó y aumentó la densidad de los NMDAR que contienen la subunidad GLUN2B. Ambos efectos se previnieron en las ratas que copularon en presencia del antagonista de CB1Rs
- h) no se detectaron cambios ni en la expresión, ni en la fosforilación de ERK 1/2 en las ratas que copularon. Sin embargo, la fosforilación de ERK 1/2 aumentó en las ratas que copularon hasta la saciedad en presencia del antagonista del CB1R.

## Sección I. Papel del CB1R en la inhibición sexual e hipersensibilidad a 8-OH-DPAT en el ATV

Se ha descrito que las ratas macho sexualmente saciadas presentan alteraciones fisiológicas y conductuales a las 24 h post-saciedad, como resultado de la cópula intensa. Entre esas alteraciones se encuentran una inhibición sexual de larga duración y una hipersensibilidad generalizada a las acciones de fármacos (Rodríguez-Manzo et al., 2011). Experimentos previos de nuestro laboratorio demostraron que la administración sistémica de un antagonista del CB1R, el AM251, durante la cópula hasta la saciedad, interfiere con la aparición de la inhibición sexual (Canseco-Alba y Rodríguez-Manzo, 2014), así como con la aparición de la PCA inducida por 8-OH-DPAT y de los efectos inhibitorios de yohimbina sobre la conducta sexual, ambos indicadores de hipersensibilidad a fármacos (González-Morales, tesis de maestría). En este trabajo mostramos que la administración de AM251 directamente en el ATV, también previene la aparición de la inhibición sexual y de la PCA inducida por 8-OH-DPAT, a las 24 h post-saciedad. Estos hallazgos muestran que la cópula hasta la saciedad induce la síntesis y liberación de eCBs en el ATV, que participan en la inducción de ambos fenómenos en las ratas sexualmente saciadas, a través de la activación del CB1R.

El fármaco que induce la PCA es el 8-OH-DPAT, un agonista serotoninérgico que actúa sobre receptores 5-HT<sub>1A</sub>. Existen reportes que indican que tanto el sistema endocannabinoide como el serotoninérgico están involucrados en la regulación de ciertos procesos fisiológicos como la temperatura corporal (Malone y Taylor, 2001), la conducta de alimentación (Ward et al., 2008), el sueño (Murillo-Rodríguez et al., 2008) y las respuestas conductuales al estrés (Resstel et al., 2009). Por otro lado, se ha reportado que los eCBs inhiben la liberación de serotonina *in vivo* a través de la activación del CB1R en algunas áreas cerebrales, tales como la corteza prefrontal y el hipocampo (Egashira et al., 2002), mientras que el bloqueo del CB1R aumenta los niveles de serotonina en la corteza prefrontal (Aso et al., 2009). Nuestros resultados muestran que el bloqueo de CB1Rs en el ATV evita la aparición de la PCA, que se asocia a niveles elevados de 5-HT (Goodwin et al., 1987; Isbister & Buckley, 2005), lo que sugiere que los eCBs liberados durante la

cópula hasta la saciedad no actúan en los CB1Rs localizados en las terminales serotoninérgicas, sino que los hacen en los que se localizan en otro tipo de neuronas y que indirectamente regulan la liberación de 5-HT en el ATV.

Las neuronas serotoninérgicas de los núcleos del rafé dorsal (DRN) y medial (MRN) proyectan a regiones límbicas y del cerebro medio, entre ellas el ATV (Lechin et al., 2006; Michelsen et al., 2007). Sin embargo, las terminales serotoninérgicas que inervan el ATV parecen jugar un papel parcial en la inducción de la PCA en las ratas saciadas, ya que se observaron diferencias en la magnitud del bloqueo de la PCA por AM251 entre la administración sistémica, que la bloqueó en la totalidad de los animales, e intra-ATV, que la bloqueó en el 75% de las ratas. Una posible explicación para esta diferencia sería el hecho de que las neuronas serotoninérgicas inervan a distintas áreas del sistema mesolímbico dopaminérgico, entre las que se encuentra el NAcc (De Deurwaerdère y Spampinato, 1999), y sabemos que en esta área también hay CB1Rs (Malinen y Hyytiä, 2008; Pedroza-Llinás et al., 2013) que podrían participar en la inducción de la hipersensibilidad a 8-OH-DPAT y que también serían bloqueados cuando el antagonista de CB1Rs se administra por vía sistémica.

En cuanto al establecimiento de la inhibición sexual, en este trabajo se observó que ésta no se previno en todos los animales pre-tratados con AM251 por vía intra-ATV, sino solamente en el 75% de los mismos. En los datos obtenidos previamente con su administración por vía sistémica, tampoco se previno el establecimiento de la inhibición sexual en todas las ratas (en esos experimentos se observó en el 85% de los animales) (Canseco-Alba y Rodríguez-Manzo, 2013), lo que sugiere que algunos animales no tienen la misma sensibilidad al tratamiento con el AM251 y que otro sistema de neurotransmisión distinto al endocannabinoide participa en la aparición de este fenómeno. Existen trabajos previos del laboratorio que indican que los sistemas de opioides endógenos también participan en el establecimiento de la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas, pues el pre-tratamiento con un antagonista de los receptores opioides  $\mu$  y  $\delta$ , la naltrexona, también previno su aparición en un 80% de las ratas sexualmente saciadas (Garduño-Gutiérrez et al., 2013). En conjunto, estos datos indican que tanto los opioides como los eCBs participan en el establecimiento de la inhibición sexual. Además, los

receptores  $\mu$  a opioides, al igual que los CB1R, se localizan en las terminales de tipo glutamatérgico y GABAérgico, tanto en NAcc como en ATV (Dilts y Kalivas, 1989; Margolis et al., 2005; Miranda-Barrientos et al., 2021), lo cual implicaría que el ATV no es el único sitio del circuito mesolímbico donde se regula la inducción de la inhibición sexual de ratas saciadas, sino también podría haber una participación de los sistemas eCB y opioidérgico en el NAcc. Debido a que el pre-tratamiento de AM251 se administró solo en el ATV, eso podría influir en que no se bloqueara la inhibición sexual en el 100 % de los animales.

Encontramos diferencias en las concentraciones de AM251 necesarias para interferir con la aparición de la inhibición sexual y la aparición de la PCA en ratas saciadas, cuando el antagonista es administrado por vía intra-ATV, lo cual apunta a que estos fenómenos se regulan de manera independiente, pues presentaron diferente sensibilidad al AM251.

De manera interesante, datos previos de nuestro laboratorio muestran que la administración sistémica de naltrexona no previene el establecimiento de la hipersensibilidad a 8-OH-DPAT en ratas que copulan hasta la saciedad (Garduño-Gutiérrez et al., 2013), lo que indica que la hipersensibilidad a fármacos es mediada por eCBs mas no por opioides endógenos.

El pre-tratamiento intra-ATV con diferentes concentraciones de AM251 produjo un efecto de U invertida sobre la inhibición sexual en las ratas saciadas, en el que sólo la administración de 1  $\mu$ L de la concentración intermedia (1mM) previno su aparición, mientras que tanto concentraciones menores como mayores del fármaco carecieron de efecto. Es importante mencionar que el AM251, además de ser un antagonista selectivo del CB1R, puede actuar también como agonista inverso sobre este receptor a dosis o concentraciones altas; es decir, puede inducir efectos contrarios a los que produce como antagonista (Shearman et al., 2003; Gorzalka et al., 2018). La ausencia de efecto a la concentración más alta de AM251 en el caso de la inhibición sexual, podría deberse a que ya esté actuando como agonista inverso. Este agonismo inverso se podría observar midiendo la internalización del CB1R en respuesta a concentraciones altas de AM251, donde se podría ver una disminución en la internalización o no tener cambios significativos

## *Sección II. Cambios en la densidad, fosforilación, internalización y RNAm del CB1R en el ATV inducidos por la cópula hasta la saciedad*

Con el objeto de evidenciar indirectamente que durante la cópula hasta la saciedad ocurre síntesis y liberación de eCB que activan al CB1R en el ATV, en este trabajo se evaluaron dos parámetros que dependen de la producción de eCB: cambios en la densidad y fosforilación del CB1R, en la expresión de su ARNm, así como en la internalización de CB1R, producidos por la cópula hasta la saciedad. Se encontró que la densidad del CB1R disminuyó, tanto en las ratas que copularon hasta la saciedad como en las que eyacularon una sola vez, pero no se detectaron cambios en la fosforilación del CB1R, ni en la expresión del ARNm del CB1R en ninguno de los grupos de ratas que copularon. Finalmente, en las ratas que copularon hasta la saciedad hubo un aumento en la internalización del CB1R en el ATV, que no se observó en animales que eyacularon una vez. En conjunto, estos resultados confirman que durante la cópula se activa CB1Rs en el ATV, aunque cabe mencionar que el CB1R puede sufrir desensibilización heteróloga, es decir, ligandos, antagonistas o incluso animales que carecen de receptores a opioides ( $\mu$ R) y/o de receptores de glutamato (mGluR) que se encuentran en la pre-sinapsis pueden interferir con la internalización del CB1R (Ghozland et al., 2002; Colmers y Bans, 2018).

Se ha descrito que la exposición prolongada o repetida a un cannabinoide o eCB (agonista exógeno o endógeno, respectivamente) induce la disminución de la densidad del CB1R (regulación a la baja), posiblemente por degradación o disminución de síntesis del receptor (Perdikaris, et al., 2018; Papadogkonaki et al., 2019). Por otro lado, a pesar de que nuestros datos muestran una disminución en la densidad de los CB1R por la actividad sexual, la densidad de CB1 fosforilados no se modificó. La falta de cambios en la fosforilación del CB1R puede deberse a que la temporalidad en la que se evaluó fue tardía y debió evaluarse dentro los primeros minutos u horas después de la cópula hasta la saciedad, ya que se ha reportado que la fosforilación de proteínas ocurre en segundos a minutos después que se activó el receptor (Ferguson 2001).

Finalmente, encontramos un aumento en la internalización del CB1R en neuronas del ATV de los machos sexualmente saciados, no así en ratas que eyacularon una vez. Existen antecedentes de que la exposición prolongada a un agonista del CB1R (WIN 55,212-2) induce la internalización del CB1R, mientras que la exposición aguda a este ligando induce internalización y reciclamiento rápidos del CB1R (Hsieh et al. 1999). Esto podría explicar que, en las ratas sexualmente saciadas, expuestas a eCBs en el ATV durante la cópula repetida (alrededor de 2.5 h) se haya detectado al CB1R internalizado, y que en las ratas que eyacularon una sola vez, con una exposición a eCBs de corta duración (máximo 30 min), ya no alcanzáramos a detectar la internalización 24 h más tarde.

Otro punto importante es que la internalización del CB1R puede ocurrir a concentraciones bajas de agonista cuando se utiliza un agonista sintético como WIN 55,212-2 (30 nM), pero se requiere de concentraciones altas de un análogo del eCB anandamida, la metanandamida (1000 nM) o del cannabinoide THC (3000 nM) para producirla (Hsieh et al. 1999). Podemos decir que la cópula hasta la saciedad implica una estimulación intensa de las neuronas DAérgicas del ATV y por ello, una liberación constante o repetida de eCBs, que podría inducir cambios en la expresión de las enzimas de síntesis y degradación de eCB; en cambio, una eyaculación implica una estimulación moderada y poca liberación de eCBs. Nuestros resultados sugieren que solo la actividad intensa induce internalización del CB1R lo que puede estar relacionado con la exposición prolongada al agonista endógeno que se mantiene durante la cópula hasta la saciedad.

La internalización de los GPCR está mediada por las  $\beta$ -arrestinas. Éstas son proteínas de andamiaje que se unen a los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), que han sido fosforilados por cinasas de GPCR (GRK) y median la desensibilización de estos receptores desacoplándolos de la señalización dependiente de proteína G (Ferguson et al., 1996; Moore et al., 2007). El reclutamiento de la  $\beta$ -arrestina 2 ( $\beta$ -A2), se ha asociado con la internalización del CB1R (Gyombolai et al., 2013). Nuestros resultados muestran que en las ratas sexualmente saciadas se presentó un aumento tanto en la inmunorreactividad a  $\beta$ -A2, como en la co-localización de CB1R y  $\beta$ -A2, indicando un aumento en la internalización del CB1R. Esto sugiere que durante

la cópula hasta la saciedad se liberan eCBs que activan CB1R, lo que resulta en su fosforilación y posterior internalización, mediada por  $\beta$ -A2.

La mayor parte de los estudios de internalización del CB1R que existen en la bibliografía utilizaron agonistas sintéticos o fitocannabinoides para determinar su expresión y función en cerebro, por lo que pocos estudios han determinado cambios en la expresión de CB1R inducidos por eCB. Dichos estudios han estado asociados a enfermedades en las que hay una excitación neuronal patológica, tales como epilepsia, enfermedad de Parkinson, carcinoma renal, cáncer, fumador de cannabis etc. (Ludányi et al., 2008; Larrinaga et al 2010; Van Laere et al., 2012; Hirvonen et al., 2012; Tutino et al., 2019). En este trabajo se demuestra por primera vez la activación e internalización de CB1Rs en neuronas del ATV, mediadas por eCB producidos por un estímulo natural, en condiciones fisiológicas.

Por otro lado, no detectamos cambios en la expresión del ARNm del CB1R en ninguno de los grupos de ratas, indicándonos que no hay síntesis de nuevos CB1R, sino que, la modulación va dirigida a una regulación a la baja de los receptores. En concordancia con los datos obtenidos en este trabajo, en un experimento donde se administró de manera crónica (por 15 días) un agonista del CB1R en hipocampo y estriado de ratones, no se detectaron cambios en el ARNm del CB1R, pero sí se encontró una regulación a la baja de la proteína del CB1R (Sim-Selley et al., 2006). La reducción en los CB1R del ATV producida por la actividad sexual tanto moderada (1 eyaculación) como intensa (cópula hasta la saciedad), permite inferir que durante la cópula se liberan eCB que activan al CB1R e inducen que éste se fosforile, internalice y posteriormente se degrade (Thibault et al., 2013), aunque en este trabajo no alcanzamos a ver cambios en la fosforilación del CB1R muy probablemente por la temporalidad en la que se determinó.

### *Sección III. Cambios en la densidad y composición de AMPAR y NMDAR en el ATV, inducidos por la cópula hasta la saciedad*

Las acciones de los eCBs en el ATV están mediadas por los CB1Rs que se encuentran en las terminales de tipo glutamatérgico y GABAérgico (Melis et al., 2004; Sperlágh et al., 2009; Martín et al., 2016) y cuya activación inhibe la

liberación de glutamato y de GABA, respectivamente (Szabo et al., 2002; Melis et al., 2004; Mátyás et al., 2008). Se sabe que tanto la transmisión glutamatérgica como la GABAérgica en el ATV participan en procesos de plasticidad sináptica. En este trabajo nos enfocamos en dilucidar la posible participación de la transmisión glutamatérgica en fenómenos de plasticidad sináptica inducida por los eCBs liberados durante la cópula hasta la saciedad. Antecedentes de nuestro laboratorio muestran que los receptores glutamatérgicos tipo AMPA, NMDA y mGluR5 participan en el mantenimiento de la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas, ya que la administración de antagonistas de estos receptores revierte la inhibición sexual de estos animales (Rodríguez-Manzo, 2015).

El ATV recibe inervación glutamatérgica que proviene de la corteza prefrontal medial (CPFm), del núcleo pedúnculo pontino (PPT) y del área tegmental laterodorsal (Clements y Grant, 1990; Tzschentke, 2001; Balfour et al., 2006). Además, existen neuronas glutamatérgicas locales, que hacen sinapsis con neuronas DAérgicas y no DAérgicas en el ATV (Yamaguchi et al., 2007; Morales y Root, 2014; Dobi et al., 2014).

La transmisión glutamatérgica del ATV participa en la estimulación del circuito MSL por la actividad sexual (Pitcher et al., 2012; Rodríguez-Manzo, 2015). Se ha demostrado que las neuronas del ATV que se activan por la cópula, determinado por la expresión de la proteína Fos, contienen NMDARs cuya subunidad constitutiva GluN1 se fosforila en respuesta a la cópula (Balfour et al., 2006). La activación de los NMDARs en esta región del cerebro es necesaria para permitir que las neuronas DAérgicas cambien su patrón de disparo de tónico a fásico (Sombers et al., 2009), lo que da por resultado un aumento en la liberación de DA en el Nacc (Karreman et al., 1996; Kretschmer, 1999).

En este trabajo se estableció que la densidad y composición de los AMPAR y NMDAR del ATV se modifica como resultado de la cópula hasta la saciedad. Nuestros datos muestran que la densidad de los AMPAR disminuye y que su composición se modifica, pues en las ratas que copulan hasta la saciedad hay un aumento en la expresión de AMPARs que contienen la subunidad GluA2. La disminución en la densidad de AMPAR se podría explicar por su endocitosis (Ashby et al., 2004) y posterior degradación proteosomal

(Zhang et al., 2009). Por otra parte, se ha descrito que la activación repetida de AMPAR que carecen de la subunidad GluA2, produce un cambio de larga duración en su composición a AMPAR que ahora contienen la subunidad GluA2 (GluA2-AMPA) (Liu y Cull-Candy, 2000). Los GluA2-AMPA son impermeables a  $Ca^{2+}$  y a  $Zn^{2+}$  y presentan una cinética lenta de apertura del poro del canal (Hollmann et al., 1991; Burnashev et al., 1992; Liu y Zukin, 2007). Dado que en las ratas sexualmente saciadas la densidad de AMPAR disminuyó y la expresión de GluA2-AMPA aumentó, podemos concluir que la proporción de estos últimos aumentó, en respuesta a la actividad sexual intensa. Este cambio es característico de un tipo de plasticidad: la depresión a largo plazo (LTD) (Chater y Goda, 2014).

Por otra parte, encontramos cambios en la composición de los NMDAR en los machos sexualmente saciados. Los cambios en la composición de este receptor también se han asociado a fenómenos de plasticidad. Las subunidades GLUN2A y GLUN2B del NMDAR juegan un papel central en la plasticidad sináptica, ya que la composición del NMDAR se modifica en respuesta a la actividad sináptica (Bellone et al., 2011), de tal manera que en las sinapsis activas hay una abundancia relativa de receptores que contienen la subunidad GluN2A (GluN2A-NMDAR) mientras que en las sinapsis inactivas predominan los NMDAR que contienen GluN2B (GluN2B-NMDAR) (Ehlers, 2003). Los GluN2A-NMDAR- presentan una alta probabilidad de apertura del poro del canal, por el contrario, los GLUN2B-NMDAR presentan una baja probabilidad de apertura del poro del canal (Lau y Zukin, 2007; Paoletti et al., 2013; Glasgow et al., 2015).

En este trabajo encontramos un aumento en la proporción de GluN2B-NMDAR, con cinética más lenta y menor probabilidad de apertura de canal, y una disminución en la proporción de GluN2A-NMDAR, caracterizada por una alta probabilidad de apertura de canal y desactivación rápida (Paoletti et al., 2013), en los animales sexualmente saciados. Estos cambios en la composición de los NMDAR, detectados a las 24 h post-saciedad, podrían indicar una reducción de la estimulación en las sinapsis glutamatérgicas del ATV, durante el estado de inhibición sexual de estos animales. Se detectó también un aumento en la expresión de la subunidad GluN2B de los NMDAR en los machos que eyacularon una vez, lo que sugiere que la estimulación

proporcionada por la actividad sexual moderada es suficiente para iniciar cambios en la composición del NMDAR.

Existe un antecedente en la literatura donde se encontró un aumento en la densidad de NMDAR, y no se detectaron cambios en la expresión de las subunidades GluA1 y GluA2 del AMPAR en el NAcc de ratas macho, 24 h después de cinco sesiones consecutivas de cópula (una eyaculación por día) (Pitchers et al., 2012). Esto indica que la conducta sexual repetida es un estímulo que puede inducir cambios en los receptores NMDA. Junto con nuestros hallazgos, estos datos muestran que una conducta recompensante natural, como lo es la actividad sexual, puede inducir cambios en la expresión de receptores de glutamato en el sistema MSL.

#### *Sección IV. Cambios en la densidad y composición de AMPAR y NMDAR en el ATV, mediados por los eCB liberados durante la cópula hasta la saciedad*

En este trabajo se dilucidó la participación de los eCBs en los cambios en la transmisión glutamatérgica inducidos por la actividad sexual intensa que tiene lugar durante la cópula hasta la saciedad. Nuestros resultados muestran que el bloqueo de los CB1Rs durante la cópula previno la disminución de la densidad de AMPAR y bloqueó los cambios en la expresión de las subunidades GluN2A y GluN2B del NMDAR, indicando que los eCBs participan en la inducción de estos cambios moleculares. No obstante, parecen no jugar un papel en el cambio en la composición de los AMPAR, ya que el bloqueo de sus acciones no modificó el aumento en la proporción de GluA2-AMPA en las ratas sexualmente saciadas.

La activación pre-sináptica del CB1R puede producir dos tipos de plasticidad relacionada con la transmisión glutamatérgica, la supresión de la excitación inducida por despolarización (DSE) (Wilson y Nicoll, 2002; Diana y Marty, 2004) y la depresión a largo plazo (LTD). Se ha descrito que la DSE ocurre debido a la despolarización prolongada de las neuronas DAérgicas del ATV, que induce la síntesis y liberación de eCBs que activan CB1Rs en terminales presinápticas glutamatérgicas, lo que suprime la transmisión glutamatérgica (Kreitzer y Regehr, 2001; Melis, 2004; Riegel y Lupica, 2004). Hay evidencias que sugieren que el eCB 2-AG es el que media la inducción de

DSE (Pan et al., 2009; Gao et al., 2010). La DSE juega un papel neuroprotector frente a la excitotoxicidad inducida por glutamato (Diana y Marty, 2004). Los cambios en los receptores glutamatérgicos del ATV descritos aquí, son consistentes con una estimulación prolongada de los receptores glutamatérgicos, inducida por la cópula intensa, ya que estos cambios se detectaron particularmente en las ratas sexualmente saciadas.

Los eCB pueden producir más de un tipo de plasticidad de largo plazo, entre las que se encuentran la depresión de largo plazo de la transmisión glutamatérgica (eCB-LTD), que se presenta en las neuronas DAérgicas del ATV, la cual requiere la activación repetida o prolongada del CB1R para ser inducida y es producida por una disminución de la liberación de glutamato (Robbe et al., 2002; Chevalleyre et al., 2006; Haj-Dahmane y Shen, 2010). Otra forma de plasticidad de largo plazo dependiente de eCB es la mGluR-LTD, también descrita en el ATV (Bellone y Lüscher, 2005), en la que la activación postsináptica de mGluRs del grupo I en las neuronas DAérgicas, desencadena la síntesis y liberación de 2-AG, que a su vez media un cambio en la composición de los AMPAR (de AMPAR carentes de la subunidad GluA2 a GluA2-AMPA) en la neurona postsináptica para inducir LTD (Wilson y Nicoll, 2002; Morikawa et al., 2003). Estas dos formas de LTD de sinapsis glutamatérgicas en las neuronas DA del ATV coexisten y podrían ser parte de los mecanismos que contribuyen a la inducción de los cambios fisiológicos de larga duración observados en las ratas sexualmente saciadas.

Hemos demostrado que evitar la activación del CB1R durante el desarrollo de la saciedad sexual, interfiere con la aparición de la inhibición sexual y la hipersensibilidad a fármacos en ratas sexualmente saciadas (González-Morales, tesis maestría). Es posible que el bloqueo de CB1Rs durante la cópula intensa haya interferido con el desarrollo de eCB-LTD, pero no con el de mGluR-LTD, puesto que durante la cópula hay liberación de glutamato que activa a sus receptores, entre ellos a los mGluRI postsinápticos, desencadenando la liberación de 2-AG que presumiblemente media el cambio en la composición de los AMPARs para inducir LTD. El hecho de que el bloqueo de CB1R durante la cópula hasta la saciedad no cancelara el aumento de GluA2-AMPA apoya la idea de que durante la cópula se libera glutamato

que actúa sobre receptores glutamatérgicos e induce cambios en la composición del AMPAR.

Los fenómenos de plasticidad mediados por eCBs pueden jugar un papel en la inducción de los cambios plásticos duraderos que caracterizan a las ratas sexualmente saciadas. La eCB-LTD es el candidato más probable, ya que su inducción depende de la activación del CB1R. Sin embargo, para determinar con certeza qué tipo de plasticidad sináptica está involucrada en los fenómenos de inhibición sexual e hipersensibilidad a fármacos de las ratas sexualmente saciadas, se requieren estudios electrofisiológicos que determinen si las neuronas del ATV presentan cambios en su actividad (aumento o disminución) que se puedan asociar con un proceso de plasticidad sináptica.

#### *Sección V. Cambios en la densidad de ERK 1/2 y pERK 1/2 en el ATV, mediados por los eCB liberados durante la cópula hasta la saciedad*

Por último, debido a que la activación de la cinasa ERK 1/2 se ha asociado a cambios plásticos, entre ellos la inducción de algunas formas de LTD (Gallagher et al., 2004; Grueter et al., 2006; Kellogg et al., 2009) específicamente en el circuito mesolímbico, y se ha descrito que la activación del CB1R por los eCBs puede inducir la activación de esta MAP cinasa (Valjent et al., 2001; Derkinderen et al., 2003), se exploró si la cópula hasta la saciedad inducía cambios en la fosforilación de ERK 1/2 y si el CB1R mediaba esos cambios. No se encontraron cambios en la fosforilación de ERK 1/2 en ratas que copularon hasta la saciedad, sin embargo, cuando se bloqueó al CB1R durante la cópula hasta la saciedad se observó un aumento de fosforilación de ERK 1/2, lo que sugiere que los eCBs liberados impiden el aumento de la fosforilación de esta MAP cinasa. Contrario a estos resultados, se ha demostrado que la activación del CB1R produce la fosforilación de ERK1/2, que participa en la inducción de LTD en neuronas dopaminérgicas del ATV que establecen sinapsis inhibitorias (I-LTD), como resultado de la exposición repetida a la cocaína (Pan et al., 2011). No se encontraron datos sobre la fosforilación de ERK1/2 mediada por CB1R en las sinapsis excitadoras; sin embargo, se ha descrito que la estimulación sostenida del CB1R activa a ERK

1/2 sólo de forma transitoria y que la duración de la activación de ERK1/2 está regulada por la desensibilización de CB1R (Daigle et al., 2008).

Por otro lado, ERK 1/2 puede ser activada por otro tipo de receptores diferentes a los CB1R, ya sea otros GPCRs o canales iónicos que participan en la regulación de la actividad del circuito mesolímbico. Entre ellos se encuentran los receptores a glutamato NMDA o AMPA; se ha descrito que la activación de NMDARs induce un aumento en la fosforilación de ERK 1/2 en neuronas del estriado dorsal e hipocampo (Choe et al., 2002; Krapivinsky et al., 2003). Así mismo, se ha reportado que los GluN2B-NMDAR activan a ERK 1/2 en rebanadas de hipocampo (Melgarejo et al., 2016). De manera interesante, en las ratas sexualmente saciadas se detectó un aumento en la densidad de GluN2B- NMDAR, lo que abre la posibilidad de que este mecanismo de activación de ERK1/2 ocurra en las ratas sexualmente saciadas, pero sea modulado por eCB, porque cuando se bloquea al CB1R se observa un aumento en la fosforilación de ERK 1/2.

En resumen, los datos obtenidos muestran que la cópula induce la liberación de eCBs en el ATV, que parece ser mayor en ratas que copulan hasta la saciedad en comparación con las ratas que eyaculan una vez. Los eCBs liberados inducen cambios plásticos en la transmisión glutamatérgica, presumiblemente sobre las neuronas DAérgicas del ATV, aunque se ha descrito que las interneuronas GABAérgicas del ATV también expresan receptores a glutamato (Zheng y Johnson, 2003). La naturaleza de los cambios en los receptores glutamatérgicos promovidos por los eCBs es consistente con una reducción de la transmisión glutamatérgica, lo que podría dar por resultado una reducción de la actividad de las neuronas DAérgicas, y quizás también de la actividad de interneuronas GABAérgicas del ATV. Estos cambios podrían jugar un papel en la inducción de los cambios fisiológicos y conductuales de larga duración que caracterizan a las ratas macho sexualmente saciadas. El presente trabajo proporciona evidencia de una función fisiológica de los eCB producidos por las neuronas DAérgicas del ATV en respuesta a un estímulo recompensante natural *in vivo*, que podría representar un mecanismo protector contra la activación excesiva del circuito mesolímbico producida por la cópula intensa.

## VIII. CONCLUSIONES

- ✓ Los eCBs participan en la inducción de la inhibición sexual de larga duración y de la hipersensibilidad a fármacos que presentan las ratas sexualmente saciadas a través de activar CB1Rs del ATV.
- ✓ Durante la cópula hasta la saciedad se liberan eCBs que activan al CB1R y dicha activación media cambios en la densidad y composición de AMPAR y NMDAR en el ATV.
- ✓ La cópula hasta la saciedad en ratas macho es un paradigma en el que se observan cambios a nivel conductual y molecular (particularmente en el ATV), por lo que podría ser empleada como modelo para estudiar cambios en la actividad sináptica del circuito de la recompensa, en respuesta a estímulos recompensantes naturales.

## X. PERSPECTIVAS

- ✓ Debido a que durante la cópula hasta la saciedad se pueden liberar 2 eCB (2-AG y Anandamida), sería bueno determinar cuál eCB o si ambos eCBs están involucrados en la aparición de la inhibición sexual e hipersensibilidad a 8-OH-DPAT en el ATV
- ✓ Existen dos receptores a eCB, el CB1R y el CB2R, por lo cual se podría determinar la posible participación del CB2R en la modulación de los fenómenos de inhibición sexual e hipersensibilidad a fármacos, así como en los cambios en la densidad de NMDAR y AMPAR inducidos por la cópula hasta la saciedad

- ✓ Dos sistemas de neurotransmisión participan en la inducción de la inhibición sexual a nivel sistémico: el endocannabinoide y el opioide, por lo cual sería interesante determinar la participación del sistema opioide en conjunto con el sistema eCB del ATV en el establecimiento de la inhibición sexual que resulta de la cópula hasta la saciedad.
- ✓ Debido a que tanto en el ATV como en el NAcc existen CB1R y se liberan eCB, se podría evaluar el papel de los eCBs del NAcc en el establecimiento de la inhibición sexual e hipersensibilidad a fármacos en ratas sexualmente saciadas.
- ✓ En el ATV tenemos una diversidad de tipos celulares, entre los cuales se encuentran neuronas GABAérgicas, glutamatérgicas, serotoninérgicas y DAérgicas, por lo tanto, sería interesante identificar la naturaleza de las neuronas del ATV en las que observamos la co-localización del CB1R con  $\beta$ -A2.
- ✓ Los canales iónicos tienen mecanismos de internalización distintos a los de los GPCRs, por lo cual sería importante establecer los posibles mecanismos implicados en el tráfico de NMDAR y AMPAR, que regulan los cambios en su densidad y composición.
- ✓ ERK puede ser activada por canales iónicos, GPCRs, etc., por lo que se podría identificar qué receptores se están activando para inducir un aumento en la fosforilación de ERK 1/2 en ratas que copulan hasta la saciedad en presencia de AM251
- ✓ Existen distintas proteínas, factores de transcripción y genes (Homer, DeltaFosB, Arc, etc.) que aumentan su actividad durante procesos de plasticidad, por lo que se podrían evaluar cambios en éstos, inducidos por conductas recompensantes
- ✓ Tanto la transmisión glutamatérgica como GABAérgica se modifican durante la inducción de cambios plásticos. Sería interesante evaluar cambios en la transmisión GABAérgica del ATV como resultado de la cópula repetida y determinar si los eCB participan en esos cambios

## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ✓ Alger, B. E. (2002). Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Progress in Neurobiology*, 68(4), 247-286.
- ✓ Alger, B. E., & Kim, J. (2011). Supply and demand for endocannabinoids. *Trends in Neurosciences*, 34(6), 304-315.
- ✓ Almada, M., Amaral, C., Diniz-da-Costa, M., Correia-da-Silva, G., Teixeira, N. A., & Fonseca, B. M. (2016). The endocannabinoid anandamide impairs in vitro decidualization of human cells. *Reproduction*, 152(4), 351-361.
- ✓ Al-Zoubi, R., Morales, P., & Reggio, P. H. (2019). Structural insights into CB1 receptor biased signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), 1837.
- ✓ Ashby, M. C., Sarah, A., Ralph, G. S., Uney, J., Collingridge, G. L., & Henley, J. M. (2004). Removal of AMPA receptors (AMPA receptors) from synapses is preceded by transient endocytosis of extrasynaptic AMPARs. *Journal of Neuroscience*, 24(22), 5172-5176.
- ✓ Aso, E., Renoir, T., Mengod, G., Ledent, C., Hamon, M., Maldonado, R. & Valverde, O. (2009). Lack of CB1 receptor activity impairs serotonergic negative feedback. *Journal of Neurochemistry*, 109(3), 935-944.
- ✓ Atkin, G., Moore, S., Lu, Y., Nelson, R. F., Tipper, N., Rajpal, G. & Paulson, H. (2015). Loss of F-box only protein 2 (Fbxo2) disrupts levels and localization of select NMDA receptor subunits, and promotes aberrant synaptic connectivity. *Journal of Neuroscience*, 35(15), 6165-6178.
- ✓ Balfour, M. E., Brown, J. L., Yu, L., & Coolen, L. M. (2006). Potential contributions of efferents from medial prefrontal cortex to neural activation following sexual behavior in the male rat. *Neuroscience*, 137(4), 1259-1276.
- ✓ Balfour, M. E., Yu, L., & Coolen, L. M. (2004). Sexual behavior and sex-associated environmental cues activate the mesolimbic system in male rats. *Neuropsychopharmacology*, 29(4), 718-730.
- ✓ Barco, A., Bailey, C. H., & Kandel, E. R. (2006). Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. *Journal of Neurochemistry*, 97(6), 1520-1533.
- ✓ Beach, F. A., & Jordan, L. (1956). Sexual exhaustion and recovery in the male rat. *Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 8(3), 121-133.
- ✓ Bellone, C., & Lüscher, C. (2005). mGluRs induce a long-term depression in the ventral tegmental area that involves a switch of the subunit composition of AMPA receptors. *European Journal of Neuroscience*, 21(5), 1280-1288.

- ✓ Bellone, C., & Nicoll, R. A. (2007). Rapid bidirectional switching of synaptic NMDA receptors. *Neuron*, 55(5), 779-785.
- ✓ Bellone, C., Mameli, M., & Lüscher, C. (2011). In utero exposure to cocaine delays postnatal synaptic maturation of glutamatergic transmission in the VTA. *Nature Neuroscience*, 14(11), 1439-1446.
- ✓ Berendsen, H. H., Jenck, F., & Broekkamp, C. L. (1989). Selective activation of 5HT1A receptors induces lower lip retraction in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 33(4), 821-827.
- ✓ Berhow, M. T., Hiroi, N., & Nestler, E. J. (1996). Regulation of ERK (extracellular signal regulated kinase), part of the neurotrophin signal transduction cascade, in the rat mesolimbic dopamine system by chronic exposure to morphine or cocaine. *Journal of Neuroscience*, 16(15), 4707-4715.
- ✓ Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Bourrie, B., Canat, X., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., & Casellas, P. (1995). Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochemical Journal*, 312(2), 637-641.
- ✓ Burnashev, N., Monyer, H., Seeburg, P. H., & Sakmann, B. (1992). Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron*, 8(1), 189-198.
- ✓ Canseco-Alba, A., & Rodríguez-Manzo, G. (2013). Anandamide transforms noncopulating rats into sexually active animals. *The Journal of Sexual Medicine*, 10(3), 686-693.
- ✓ Canseco-Alba, A., & Rodríguez-Manzo, G. (2014). Low anandamide doses facilitate male rat sexual behaviour through the activation of CB1 receptors. *Psychopharmacology*, 231(20), 4071-4080.
- ✓ Chater, T. E., & Goda, Y. (2014). The role of AMPA receptors in postsynaptic mechanisms of synaptic plasticity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(NOV), 1-14.
- ✓ Chevalleyre V, Castillo PE. 2003. Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability. *Neuron* 38:461-72
- ✓ Chevalleyre, V., Takahashi, K. A., & Castillo, P. E. (2006). Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annual Review of Neuroscience*, 29, 37-76.
- ✓ Choe, E. S., Chung, K. T., Mao, L., & Wang, J. Q. (2002). Amphetamine increases phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and transcription factors in the rat striatum via group I metabotropic glutamate receptors. *Neuropsychopharmacology*, 27(4), 565-575.
- ✓ Clark, J. T., Smith, E. R., & Davidson, J. M. (1984). Enhancement of sexual motivation in male rats by yohimbine. *Science*, 225(4664), 847-849.
- ✓ Clements, J. R., & Grant, S. (1990). Glutamate-like immunoreactivity in neurons of the laterodorsal tegmental and pedunculopontine nuclei in the rat. *Neuroscience Letters*, 120(1), 70-73.
- ✓ Colmers, P. L., & Bains, J. S. (2018). Presynaptic mGluRs control the duration of endocannabinoid-mediated DSI. *Journal of Neuroscience*, 38(49), 10444-10453.
- ✓ Coogan, A. N., O'Leary, D. M., & O'Connor, J. J. (1999). P42/44 MAP kinase inhibitor PD98059 attenuates multiple forms of synaptic plasticity in rat dentate gyrus in vitro. *Journal of Neurophysiology*, 81(1), 103-110.

- ✓ Covey, D. P., Mateo, Y., Sulzer, D., Cheer, J. F., & Lovinger, D. M. (2017). Endocannabinoid modulation of dopamine neurotransmission. *Neuropharmacology*, 124, 52-61.
- ✓ Curtis, J., & Finkbeiner, S. (1999). Sending signals from the synapse to the nucleus: possible roles for CaMK, Ras/ERK, and SAPK pathways in the regulation of synaptic plasticity and neuronal growth. *Journal of Neuroscience Research*, 58(1), 88-95
- ✓ Curzon, G. (1990). Stereotyped and other motor responses to 5-hydroxytryptamine receptor activation. *Neurobiology of Stereotyped Behaviour*, 142-168.
- ✓ Daigle, T. L., Kearns, C. S., & Mackie, K. (2008). Rapid CB1 cannabinoid receptor desensitization defines the time course of ERK1/2 MAP kinase signaling. *Neuropharmacology*, 54(1), 36-44.
- ✓ De Deurwaerdère, P., & Spampinato, U. (1999). Role of serotonin<sub>2A</sub> and serotonin<sub>2B/2C</sub> receptor subtypes in the control of accumbal and striatal dopamine release elicited in vivo by dorsal raphe nucleus electrical stimulation. *Journal of Neurochemistry*, 73(3), 1033-1042.
- ✓ Derkach, V. A., Oh, M. C., Guire, E. S., & Soderling, T. R. (2007). Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(2), 101-113.
- ✓ Derkinderen, P., Valjent, E., Toutant, M., Corvol, J. C., Enslin, H., Ledent, C., & Girault, J. A. (2003). Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 23(6), 2371-2382.
- ✓ Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T., & De Petrocellis, L. (1998). Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends in Neurosciences*, 21(12), 521-528.
- ✓ Diana, M. A., & Marty, A. (2004). Endocannabinoid-mediated short-term synaptic plasticity: depolarization-induced suppression of inhibition (DSI) and depolarization-induced suppression of excitation (DSE). *British Journal of Pharmacology*, 142(1), 9-19.
- ✓ Dilts, R. P., & Kalivas, P. W. (1989). Autoradiographic localization of  $\mu$ -opioid and neurotensin receptors within the mesolimbic dopamine system. *Brain Research*, 488(1-2), 311-327.
- ✓ Dobi, A., Margolis, E. B., Wang, H. L., Harvey, B. K., & Morales, M. (2010). Glutamatergic and nonglutamatergic neurons of the ventral tegmental area establish local synaptic contacts with dopaminergic and nondopaminergic neurons. *Journal of Neuroscience*, 30(1), 218-229.
- ✓ Dourish, C. T., Hutson, P. H., & Curzon, G. (1985). Low doses of the putative serotonin agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT) elicit feeding in the rat. *Psychopharmacology*, 86(1), 197-204.
- ✓ Egashira, N., Mishima, K., Katsurabayashi, S., Yoshitake, T., Matsumoto, Y., Ishida, J. & Fujiwara, M. (2002). Involvement of 5-hydroxytryptamine neuronal system in  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-induced impairment of spatial memory. *European Journal of Pharmacology*, 445(3), 221-229.
- ✓ Ehlers, M. D. (2003). Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nature Neuroscience*, 6(3), 231-242.
- ✓ Eiberger, R. D. & Caggiula, A. R. (1973). Ventral midbrain involvement in copulatory behavior of the male rat. *Physiology & Behavior*, 10(3), 435-441.

- ✓ English, J. D. & Sweatt, J. D. (1996). Activation of p42 mitogen-activated protein kinase in hippocampal long term potentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 271(40), 24329-24332.
- ✓ Everitt, B. J. (1990). Sexual motivation: a neural and behavioural analysis of the mechanisms underlying appetitive and copulatory responses of male rats. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 14(2), 217-232.
- ✓ Ferguson, S. S., Downey, W. E., Colapietro, A. M., Barak, L. S., Ménard, L., & Caron, M. G. (1996). Role of  $\beta$ -arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science*, 271(5247), 363-366.
- ✓ Ferrada, C., Sotomayor-Zárate, R., Abarca, J., & Gysling, K. (2017). The activation of metabotropic glutamate 5 receptors in the rat ventral tegmental area increases dopamine extracellular levels. *NeuroReport*, 28(1), 28-34.
- ✓ Fiorino, D. F., Coury, A., & Phillips, A. G. (1997). Dynamic changes in nucleus accumbens dopamine efflux during the Coolidge effect in male rats. *Journal of Neuroscience*, 17(12), 4849-4855.
- ✓ Freund, T. F., Katona, I., & Piomelli, D. (2003). Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiological Reviews*.
- ✓ Fricks-Gleason, A. N., & Marshall, J. F. (2011). Role of dopamine D1 receptors in the activation of nucleus accumbens extracellular signal-regulated kinase (ERK) by cocaine-paired contextual cues. *Neuropsychopharmacology*, 36(2), 434-444.
- ✓ Galiegue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carriere, D., Carayon, P., & Casellas, P. (1995). Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *The FEBS Journal*, 232(1), 54-61
- ✓ Gallagher, S. M., Daly, C. A., Bear, M. F., & Huber, K. M. (2004). Extracellular signal-regulated protein kinase activation is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression in hippocampal area CA1. *Journal of Neuroscience*, 24(20), 4859-4864.
- ✓ Gao, Y., Vasilyev, D. V., Goncalves, M. B., Howell, F. V., Hobbs, C., Reisenberg, M. & Doherty, P. (2010). Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice. *Journal of Neuroscience*, 30(6), 2017-2024.
- ✓ Garduño-Gutiérrez, R., León-Olea, M. & Rodríguez-Manzo, G. (2013). Different amounts of ejaculatory activity, a natural rewarding behavior, induce differential mu and delta opioid receptor internalization in the rat's ventral tegmental area. *Brain Research*, 1541, 22-32.
- ✓ Gerdeman GL, Ronesi J, Lovinger DM. 2002. Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat. Neurosci.* 5:446–51
- ✓ Gerson, S. C., & Baldessarini, R. J. (1980). Motor effects of serotonin in the central nervous system. *Life Sciences*, 27(16), 1435-1451.
- ✓ Ghozland, S., Matthes, H. W., Simonin, F., Filliol, D., Kieffer, B. L., & Maldonado, R. (2002). Motivational effects of cannabinoids are mediated by  $\mu$ -opioid and  $\kappa$ -opioid receptors. *Journal of Neuroscience*, 22(3), 1146-1154.
- ✓ Girault, J. A., Valjent, E., Caboche, J., & Hervé, D. (2007). ERK2: a logical AND gate critical for drug-induced plasticity? *Current Opinion in Pharmacology*, 7(1), 77-85.

- ✓ Gladding, C. M., & Raymond, L. A. (2011). Mechanisms underlying NMDA receptor synaptic/extrasynaptic distribution and function. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 48(4), 308-320.
- ✓ Glasgow, N. G., Retchless, B. S., & Johnson, J. W. (2015). Molecular bases of NMDA receptor subtype-dependent properties. *The Journal of Physiology*, 593(1), 83-95.
- ✓ González-Morales E. (2016). Evaluación de la posible participación de endocannabinoides y de dopamina en el fenómeno de hipersensibilidad a fármacos inducido por la cópula hasta la saciedad en ratas macho. CINVESTAV
- ✓ Goodwin, G. M., De Souza, R. J., Green, A. R., & Heal, D. J. (1987). The pharmacology of the behavioral and hypothermic responses of rats to 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT). *Psychopharmacology*, 91(4), 506-511.
- ✓ Gorzalka, B. B., Morrish, A. C., & Hill, M. N. (2008). Endocannabinoid modulation of male rat sexual behavior. *Psychopharmacology*, 198(4), 479-486.
- ✓ Grace, A. A., Floresco, S. B., Goto, Y., & Lodge, D. J. (2007). Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends in Neurosciences*, 30(5), 220-227.
- ✓ Grueter, B. A., Gosnell, H. B., Olsen, C. M., Schramm-Sapyta, N. L., Nekrasova, T., Landreth, G. E., & Winder, D. G. (2006). Extracellular-signal regulated kinase 1-dependent metabotropic glutamate receptor 5-induced long-term depression in the bed nucleus of the stria terminalis is disrupted by cocaine administration. *Journal of Neuroscience*, 26(12), 3210-3219.
- ✓ Guadarrama-Bazante, I. L., & Rodríguez-Manzo, G. (2019). Nucleus accumbens dopamine increases sexual motivation in sexually satiated male rats. *Psychopharmacology*, 236(4), 1303-1312.
- ✓ Guzmán, D., Carreira, M. B., Friedman, A. K., Adachi, M., Neve, R. L., Monteggia, L. M., & Self, D. W. (2018). Inactivation of NMDA Receptors in the Ventral Tegmental Area during Cocaine Self-Administration Prevents GluA1 Upregulation but with Paradoxical Increases in Cocaine-Seeking Behavior. *Journal of Neuroscience*, 38(3), 575-585.
- ✓ Gyombolai, P., Boros, E., Hunyady, L., & Turu, G. (2013). Differential  $\beta$ -arrestin2 requirements for constitutive and agonist-induced internalization of the CB1 cannabinoid receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 372(1-2), 116-127.
- ✓ Haj-Dahmane, S., & Shen, R. Y. (2010). Regulation of plasticity of glutamate synapses by endocannabinoids and the cyclic-AMP/protein kinase A pathway in midbrain dopamine neurons. *Journal of Physiology*, 588(14), 2589–2604.
- ✓ Hardingham, G. E., & Bading, H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(10), 682-696.
- ✓ Harris, G. C., Wimmer, M., Byrne, R., & Aston-Jones, G. (2004). Glutamate-associated plasticity in the ventral tegmental area is necessary for conditioning environmental stimuli with morphine. *Neuroscience*, 129(3), 841-847.
- ✓ Hayn, M. H., Ballesteros, I., de Miguel, F., Coyle, C. H., Tyagi, S., Yoshimura, N. & Tyagi, P. (2008). Functional and immunohistochemical

characterization of CB1 and CB2 receptors in rat bladder. *Urology*, 72(5), 1174-1178.

✓ Hearing, M. C., Zink, A. N., & Wickman, K. (2012). Cocaine-induced adaptations in metabotropic inhibitory signaling in the mesocorticolimbic system. *Reviews in the Neurosciences*, 23(4), 325-351.

✓ Herkenham, M., Lynn, A. B., de Costa, B. R., & Richfield, E. K. (1991). Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Research*, 547(2), 267-274.

✓ Hirvonen, J., Goodwin, R. S., Li, C. T., Terry, G. E., Zoghbi, S. S., Morse, C. & Innis, R. B. (2012). Reversible and regionally selective downregulation of brain cannabinoid CB 1 receptors in chronic daily cannabis smokers. *Molecular Psychiatry*, 17(6), 642-649.

✓ Hoffman, A. F., & Lupica, C. R. (2001). Direct actions of cannabinoids on synaptic transmission in the nucleus accumbens: a comparison with opioids. *Journal of Neurophysiology*, 85(1), 72-83.

✓ Hollmann, M., Hartley, M., & Heinemann, S. (1991). Ca<sup>2+</sup> permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science*, 252(5007), 851-853.

✓ Holtmaat, A., & Caroni, P. (2016). Functional and structural underpinnings of neuronal assembly formation in learning. *Nature Neuroscience*, 19(12), 1553-1562.

✓ Hsieh, C., Brown, S., Derleth, C., & Mackie, K. (1999). Internalization and recycling of the CB1 cannabinoid receptor. *Journal of Neurochemistry*, 73(2), 493-501.

✓ Hull, E., & Rodríguez-Manzo, G. (2009). Males sex behavior. Brain and behavior (2nd ed.). San Diego, CA: Academic Press/Elsevier.

✓ Ikemoto, S. (2007). Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens–olfactory tubercle complex. *Brain Research Reviews*, 56(1), 27-78.

✓ Isbister, G. K., & Buckley, N. A. (2005). The pathophysiology of serotonin toxicity in animals and humans: implications for diagnosis and treatment. *Clinical Neuropharmacology*, 28(5), 205-214.

✓ Jeong, W. J., Park, J. C., Kim, W. S., Ro, E. J., Jeon, S. H., Lee, S. K. & Choi, K. Y. (2019). WDR76 is a RAS binding protein that functions as a tumor suppressor via RAS degradation. *Nature Communications*, 10(1), 1-11.

✓ Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimoto-dani, Y., Uchigashima, M., & Watanabe, M. (2009). Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiological Reviews*, 89(1), 309-380.

✓ Karreman, M., Westerink, B. H., & Moghaddam, B. (1996). Excitatory amino acid receptors in the ventral tegmental area regulate dopamine release in the ventral striatum. *Journal of Neurochemistry*, 67(2), 601-607.

✓ Kelley, A. E., & Berridge, K. C. (2002). The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *Journal of Neuroscience*, 22(9), 3306-3311.

✓ Kellogg, R., Mackie, K., & Straiker, A. (2009). Cannabinoid CB1 receptor-dependent long-term depression in autaptic excitatory neurons. *Journal of Neurophysiology*, 102(2), 1160-1171.

✓ Kendall, D. A., & Yudowski, G. A. (2017). Cannabinoid receptors in the central nervous system: their signaling and roles in disease. *Frontiers in cellular neuroscience*, 10, 294.

- ✓ Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Manasian, Y., Ivanov, A., Tyzio, R., Pellegrino, C. & Medina, I. (2003). The NMDA receptor is coupled to the ERK pathway by a direct interaction between NR2B and RasGRF1. *Neuron*, 40(4), 775-784.
- ✓ Kreitzer, A. C., & Regehr, W. G. (2001). Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron*, 29(3), 717-727.
- ✓ Kretschmer, B. D. (1999). Modulation of the mesolimbic dopamine system by glutamate: role of NMDA receptors. *Journal of Neurochemistry*, 73(2), 839-848.
- ✓ Lai, T. K., Zhai, D., Su, P., Jiang, A., Boychuk, J., & Liu, F. (2019). The receptor-receptor interaction between mGluR1 receptor and NMDA receptor: a potential therapeutic target for protection against ischemic stroke. *The FASEB Journal*, 33(12), 14423-14439.
- ✓ Larrinaga, G., Begoña, S., Itxaro, P., Blanco, L., Maria, L. C., Pinto, F. M., & José, I. L. (2010). Cannabinoid CB1 receptor is downregulated in clear cell renal cell carcinoma. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 58(12), 1129-1134.
- ✓ Lau, C. G., & Zukin, R. S. (2007). NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(6), 413-426.
- ✓ Lechin, F., van der Dijs, B., & Hernández-Adrián, G. (2006). Dorsal raphe vs. median raphe serotonergic antagonism. Anatomical, physiological, behavioral, neuroendocrinological, neuropharmacological and clinical evidences: relevance for neuropharmacological therapy. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 30(4), 565-585.
- ✓ Lesscher, H. M., Burbach, J. P. H., Van Ree, J. M., & Gerrits, M. A. (2003). ERK1/2 activation in rat ventral tegmental area by the  $\mu$ -opioid agonist fentanyl: an in vitro study. *Neuroscience*, 116(1), 139-144.
- ✓ Lin, H. C., Tseng, Y. C., Mao, S. C., Chen, P. S., & Gean, P. W. (2011). GABAA receptor endocytosis in the basolateral amygdala is critical to the reinstatement of fear memory measured by fear-potentiated startle. *Journal of Neuroscience*, 31(24), 8851-8861.
- ✓ Liu, S. J., & Zukin, R. S. (2007). Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. *Trends in Neurosciences*, 30(3), 126-134.
- ✓ Liu, S. Q. J., & Cull-Candy, S. G. (2000). Synaptic activity at calcium-permeable AMPA receptors induces a switch in receptor subtype. *Nature*, 405(6785), 454-458.
- ✓ Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- ✓ Lu, L., Koya, E., Zhai, H., Hope, B. T., & Shaham, Y. (2006). Role of ERK in cocaine addiction. *Trends in Neurosciences*, 29(12), 695-703.
- ✓ Ludányi, A., Erőss, L., Czirják, S., Vajda, J., Halász, P., Watanabe, M., ... & Katona, I. (2008). Downregulation of the CB1 cannabinoid receptor and related molecular elements of the endocannabinoid system in epileptic human hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 28(12), 2976-2990.

- ✓ Lupica, C. R., & Riegel, A. C. (2005). Endocannabinoid release from midbrain dopamine neurons: a potential substrate for cannabinoid receptor antagonist treatment of addiction. *Neuropharmacology*, *48*(8), 1105-1116.
- ✓ Malenka, R. C., & Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*, *44*(1), 5-21.
- ✓ Malinen, H., & Hyytiä, P. (2008). Ethanol self-administration is regulated by CB1 receptors in the nucleus accumbens and ventral tegmental area in alcohol-preferring AA rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *32*(11), 1976-1983.
- ✓ Malone, D. T., & Taylor, D. A. (2001). Involvement of somatodendritic 5-HT<sub>1A</sub> receptors in  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol-induced hypothermia in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *69*(3-4), 595-601.
- ✓ Mamelì, M., Bellone, C., Brown, M. T., & Lüscher, C. (2011). Cocaine inverts rules for synaptic plasticity of glutamate transmission in the ventral tegmental area. *Nature Neuroscience*, *14*(4), 414-416.
- ✓ Margolis, E. B., Hjelmstad, G. O., Bonci, A., & Fields, H. L. (2005). Both kappa and mu opioid agonists inhibit glutamatergic input to ventral tegmental area neurons. *Journal of Neurophysiology*, *93*(6), 3086-3093.
- ✓ Margolis, E. B., Toy, B., Himmels, P., Morales, M., & Fields, H. L. (2012). Identification of rat ventral tegmental area GABAergic neurons. *PloS One*, *7*(7), e42365.
- ✓ Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, et al. 2002. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418:530–34
- ✓ Martín-García, E., Bourgoin, L., Cathala, A., Kasanetz, F., Mondesir, M., Gutiérrez-Rodríguez, A., & Deroche-Gamonet, V. (2016). Differential control of cocaine self-administration by GABAergic and glutamatergic CB1 cannabinoid receptors. *Neuropsychopharmacology*, *41*(9), 2192-2205.
- ✓ Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., & Bonner, T. I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, *346*(6284), 561-564.
- ✓ Mátyás, F., Urbán, G. M., Watanabe, M., Mackie, K., Zimmer, A., Freund, T. F., & Katona, I. (2008). Identification of the sites of 2-arachidonoylglycerol synthesis and action imply retrograde endocannabinoid signaling at both GABAergic and glutamatergic synapses in the ventral tegmental area. *Neuropharmacology*, *54*(1), 95-107.
- ✓ Mátyás, F., Watanabe, M., Mackie, K., Katona, I., & Freund, T. F. (2007). Molecular architecture of the cannabinoid signaling system in the core of the nucleus accumbens. *Ideggyogyaszati Szemle*, *60*(3-4), 187-191.
- ✓ McClung, C. A., & Nestler, E. J. (2008). Neuroplasticity mediated by altered gene expression. *Neuropsychopharmacology*, *33*(1), 3-17.
- ✓ Mechoulam, R., Fride, E., & Di Marzo, V. (1998). Endocannabinoids. *European Journal of Pharmacology*, *359*(1), 1-18.
- ✓ Melgarejo da Rosa, M., Yuanxiang, P., Brambilla, R., Kreutz, M. R., & Karpova, A. (2016). Synaptic GluN2B/CaMKII- $\alpha$  signaling induces synaptoneuronal transport of ERK and Jacob. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *9*, 66.
- ✓ Melis, M., Pistis, M., Perra, S., Muntoni, A. L., Pillolla, G., & Gessa, G. L. (2004). Endocannabinoids mediate presynaptic inhibition of glutamatergic

transmission in rat ventral tegmental area dopamine neurons through activation of CB1 receptors. *Journal of Neuroscience*, 24(1), 53-62.

✓ Michelsen, K. A., Schmitz, C., & Steinbusch, H. W. (2007). The dorsal raphe nucleus—from silver stainings to a role in depression. *Brain Research Reviews*, 55(2), 329-342.

✓ Miranda-Barrientos, J., Chambers, I., Mongia, S., Liu, B., Wang, H. L., Mateo-Semidey, G. E., & Morales, M. (2021). Ventral tegmental area GABA, glutamate, and glutamate-GABA neurons are heterogeneous in their electrophysiological and pharmacological properties. *European Journal of Neuroscience*

✓ Moore, C. A., Milano, S. K., & Benovic, J. L. (2007). Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annual Review of Physiology*, 69, 451-482.

✓ Morales, M., & Root, D. H. (2014). Glutamate neurons within the midbrain dopamine regions. *Neuroscience*, 282, 60-68.

✓ Morikawa, H., Khodakhah, K., & Williams, J. T. (2003). Two intracellular pathways mediate metabotropic glutamate receptor-induced Ca<sup>2+</sup> mobilization in dopamine neurons. *Journal of Neuroscience*, 23(1), 149-157.

✓ Munro, S., Thomas, K. L., & Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365(6441), 61-65.

✓ Murillo-Rodríguez, E., Millán-Aldaco, D., Di Marzo, V., & Drucker-Colin, R. (2008). The anandamide membrane transporter inhibitor, VDM-11, modulates sleep and c-Fos expression in the rat brain. *Neuroscience*, 157(1), 1-11.

✓ Nabavi, S., Fox, R., Proulx, C. D., Lin, J. Y., Tsien, R. Y., & Malinow, R. (2014). Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature*, 511(7509), 348.

✓ Nair-Roberts, R. G., Chatelain-Badie, S. D., Benson, E., White-Cooper, H., Bolam, J. P., & Ungless, M. A. (2008). Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience*, 152(4), 1024-1031.

✓ Nakanishi, S., Nakajima, Y., Masu, M., Ueda, Y., Nakahara, K., Watanabe, D., & Okada, M. (1998). Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Research Reviews*, 26(2-3), 230-235.

✓ Pan, B., Wang, W., Long, J. Z., Sun, D., Hillard, C. J., Cravatt, B. F., & Liu, Q. S. (2009). Blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis by selective monoacylglycerol lipase inhibitor 4-nitrophenyl 4-(dibenzo [d] [1, 3] dioxol-5-yl (hydroxy) methyl) piperidine-1-carboxylate (JZL184) Enhances retrograde endocannabinoid signaling. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 331(2), 591-597.

✓ Pan, B., Zhong, P., Sun, D., & Liu, Q. S. (2011). Extracellular signal-regulated kinase signaling in the ventral tegmental area mediates cocaine-induced synaptic plasticity and rewarding effects. *Journal of Neuroscience*, 31(31), 11244-11255.

✓ Paoletti, P., Bellone, C., & Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(6), 383-400.

- ✓ Papadogkonaki, S., Theodorakis, K., & Thermos, K. (2019). Endogenous and synthetic cannabinoids induce the downregulation of cannabinoid CB1 receptor in retina. *Experimental Eye Research*, 185, 107694.
- ✓ Parsons, L. H., & Hurd, Y. L. (2015). Endocannabinoid signalling in reward and addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(10), 579-594.
- ✓ Pascoli, V., Cahill, E., Bellivier, F., Caboche, J., & Vanhoutte, P. (2014). Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 activation by addictive drugs: a signal toward pathological adaptation. *Biological Psychiatry*, 76(12), 917-926.
- ✓ Paxinos, G., Watson, C., Carrive, P., Kirkcaldie, M. T. K., & Ashwell, K. (2009). Chemoarchitectonic Atlas of the Rat Brain.
- ✓ Pedroza-Llinás, R., Méndez-Díaz, M., Ruiz-Contreras, A. E., & Prospéro-García, Ó. (2013). CB1 receptor activation in the nucleus accumbens core impairs contextual fear learning. *Behavioural Brain Research*, 237, 141-147.
- ✓ Perdikaris, P., Tsarouchi, M., Fanarioti, E., Natsaridis, E., Mitsacos, A., & Giompres, P. (2018). Long lasting effects of chronic WIN55, 212-2 treatment on mesostriatal dopaminergic and cannabinoid systems in the rat brain. *Neuropharmacology*, 129, 1-15.
- ✓ Perkinson, M. S., Sihra, T. S., & Williams, R. J. (1999). Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors induce phosphorylation of cAMP response element-binding protein through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent stimulation of the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in neurons. *Journal of Neuroscience*, 19(14), 5861-5874.
- ✓ Peterson, G. L. (1979). Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical Biochemistry*, 100(2), 201-220.
- ✓ Pfaus, J. G., Damsma, G., Nomikos, G. G., Wenkstern, D. G., Blaha, C. D., Phillips, A. G., & Fibiger, H. C. (1990). Sexual behavior enhances central dopamine transmission in the male rat. *Brain Research*, 530(2), 345-348.
- ✓ Pignatelli, M., & Bonci, A. (2015). Role of dopamine neurons in reward and aversion: a synaptic plasticity perspective. *Neuron*, 86(5), 1145-1157.
- ✓ Pina, M. M., & Cunningham, C. L. (2016). Involvement of ventral tegmental area ionotropic glutamate receptors in the expression of ethanol-induced conditioned place preference. *Behavioural Brain Research*, 313, 23-29.
- ✓ Pitchers, K. K., Schmid, S., Di Sebastiano, A. R., Wang, X., Laviolette, S. R., Lehman, M. N., & Coolen, L. M. (2012). Natural reward experience alters AMPA and NMDA receptor distribution and function in the nucleus accumbens. *PloS One*, 7(4), e34700.
- ✓ Resstel, L. B., Tavares, R. F., Lisboa, S. F., Joca, S. R., Corrêa, F. M., & Guimarães, F. S. (2009). 5-HT<sub>1A</sub> receptors are involved in the cannabidiol-induced attenuation of behavioural and cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *British Journal of Pharmacology*, 156(1), 181-188.
- ✓ Riegel, A. C., & Lupica, C. R. (2004). Independent presynaptic and postsynaptic mechanisms regulate endocannabinoid signaling at multiple synapses in the ventral tegmental area. *Journal of Neuroscience*, 24(49), 11070-11078.
- ✓ Robbe D, Kopf M, Remaury A, Bockaert J, Manzoni OJ. 2002b. Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:8384–88

- ✓ Robbe, D., Alonso, G., Duchamp, F., Bockaert, J., & Manzoni, O. J. (2001). Localization and mechanisms of action of cannabinoid receptors at the glutamatergic synapses of the mouse nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience*, 21(1), 109-116.
- ✓ Robbe, D., Kopf, M., Remaury, A., Bockaert, J., & Manzoni, O. J. (2002). Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(12), 8384-8388.
- ✓ Roberson, E. D., English, J. D., Adams, J. P., Selcher, J. C., Kondratick, C., & Sweatt, J. D. (1999). The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 19(11), 4337-4348.
- ✓ Rodríguez-Manzo G., & Fernández-Guasti A. (1995a) Sociedad Sexual. En Velázquez M.J., Temas selectos de neurociencias. Universidad Autónoma Metropolitana. México. p.p 229-248
- ✓ Rodríguez-Manzo, G. (1999). Yohimbine interacts with the dopaminergic system to reverse sexual satiation: further evidence for a role of sexual motivation in sexual exhaustion. *European Journal of Pharmacology*, 372(1), 1-8.
- ✓ Rodríguez-Manzo, G. (2015). Glutamatergic transmission is involved in the long lasting sexual inhibition of sexually exhausted male rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 131, 64-70.
- ✓ Rodríguez-Manzo, G., & Fernández-Guasti, A. (1994). Reversal of sexual exhaustion by serotonergic and noradrenergic agents. *Behavioural Brain Research*, 62(2), 127-134.
- ✓ Rodríguez-Manzo, G., & Fernández-Guasti, A. (1995b). Opioid antagonists and the sexual satiation phenomenon. *Psychopharmacology*, 122(2), 131-136.
- ✓ Rodríguez-Manzo, G., & Pellicer, F. (2007). Electrical stimulation of the ventral tegmental area exerts opposite effects on male rat sexual behaviour expression depending on the stimulated sub region. *Behavioural Brain research*, 179(2), 310-313.
- ✓ Rodríguez-Manzo, G., & Pellicer, F. (2010). Electrical stimulation of dorsal and ventral striatum differentially alters the copulatory behavior of male rats. *Behavioral Neuroscience*, 124(5), 686.
- ✓ Rodríguez-Manzo, G., Guadarrama-Bazante, I. L., & Morales-Calderón, A. (2011). Recovery from sexual exhaustion-induced copulatory inhibition and drug hypersensitivity follow a same time course: two expressions of a same process? *Behavioural Brain Research*, 217(2), 253-260.
- ✓ 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. *Behavioral Neuroscience*, 114(3), 553.
- ✓ Sachs B.D., & Meisel R.L. (1998) The physiology of reproduction. In: The physiology of male sexual behavior, Vol. 2 (Knobil E, Neil DJ, eds), p 1396. New York: Raven Press.
- ✓ Scherma, M., Qvist, J. S., Asok, A., Shao-shan, C. H., Masia, P., Deidda, M. & Melas, P. A. (2020). Cannabinoid exposure in rat adolescence reprograms the initial behavioral, molecular, and epigenetic response to

cocaine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(18), 9991-10002.

✓ Shearman, L. P., Rosko, K. M., Fleischer, R., Wang, J., Xu, S., Tong, X. S., & Rocha, B. A. (2003). Antidepressant-like and anorectic effects of the cannabinoid CB1 receptor inverse agonist AM251 in mice. *Behavioural Pharmacology*, 14(8), 573-582.

✓ Sim-Selley, L. J., Schechter, N. S., Rorrer, W. K., Dalton, G. D., Hernandez, J., Martin, B. R., & Selley, D. E. (2006). Prolonged recovery rate of CB1 receptor adaptation after cessation of long-term cannabinoid administration. *Molecular Pharmacology*, 70(3), 986-996.

✓ Smith, L. M., & Peroutka, S. J. (1986). Differential effects of 5-hydroxytryptamine<sub>1a</sub> selective drugs on the 5-HT behavioral syndrome. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 24(6), 1513-1519.

✓ Sombers, L. A., Beyene, M., Carelli, R. M., & Wightman, R. M. (2009). Synaptic overflow of dopamine in the nucleus accumbens arises from neuronal activity in the ventral tegmental area. *Journal of Neuroscience*, 29(6), 1735-1742.

✓ Sperrágh, B., Windisch, K., Andó, R. D., & Vizi, E. S. (2009). Neurochemical evidence that stimulation of CB1 cannabinoid receptors on GABAergic nerve terminals activates the dopaminergic reward system by increasing dopamine release in the rat nucleus accumbens. *Neurochemistry International*, 54(7), 452-457.

✓ Stefani, A., Chen, Q., Flores-Hernandez, J., Jiao, Y., Reiner, A., & Surmeier, D. J. (1998). Physiological and molecular properties of AMPA/Kainate receptors expressed by striatal medium spiny neurons. *Developmental Neuroscience*, 20(2-3), 242-252.

✓ Sternbach, H. (1991). The serotonin syndrome. *Am J Psychiatry*, 148(6), 705-713.

✓ Sweatt, J. D. (2001). The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *Journal of Neurochemistry*, 76(1), 1-10.

✓ Sweatt, J. D. (2004). Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Current Opinion in Neurobiology*, 14(3), 311-317.

✓ Szabo, B., Siemes, S., & Wallmichrath, I. (2002). Short communication Inhibition of GABAergic neurotransmission in the ventral tegmental area by cannabinoids. *European Journal of Neuroscience*, 15(12), 2057-2061.

✓ Thibault, K., Carrel, D., Bonnard, D., Gallatz, K., Simon, A., Biard, M., & Lenkei, Z. (2013). Activation-dependent subcellular distribution patterns of CB1 cannabinoid receptors in the rat forebrain. *Cerebral Cortex*, 23(11), 2581-2591.

✓ Thomas, G. M., & Huganir, R. L. (2004). MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(3), 173-183.

✓ Tovar, K. R., & Westbrook, G. L. (2002). Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses. *Neuron*, 34(2), 255-264.

✓ Travaglia, A., Bisaz, R., Cruz, E., & Alberini, C. M. (2016). Developmental changes in plasticity, synaptic, glia and connectivity protein levels in rat dorsal hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, 135, 125-138.

✓ Tricklebank, M. D., Forler, C., & Fozard, J. R. (1984). The involvement of subtypes of the 5-HT<sub>1</sub> receptor and of catecholaminergic systems in the

behavioural response to 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin in the rat. *European Journal of Pharmacology*, 106(2), 271-282.

✓ Tutino, V., Caruso, M. G., De Nunzio, V., Lorusso, D., Veronese, N., Gigante, I., & Giannelli, G. (2019). Down-Regulation of Cannabinoid Type 1 (CB1) Receptor and its Downstream Signaling Pathways in Metastatic Colorectal Cancer. *Cancers*, 11(5), 708.

✓ Tzschentke, T. M. (2001). Pharmacology and behavioral pharmacology of the mesocortical dopamine system. *Progress in Neurobiology*, 63(3), 241-320.

✓ Valjent, E., Corvol, J. C., Pagès, C., Besson, M. J., Maldonado, R., & Caboche, J. (2000). Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties. *Journal of Neuroscience*, 20(23), 8701-8709.

✓ Valjent, E., Pagès, C., Hervé, D., Girault, J. A., & Caboche, J. (2004). Addictive and non-addictive drugs induce distinct and specific patterns of ERK activation in mouse brain. *European Journal of Neuroscience*, 19(7), 1826-1836.

✓ Valjent, E., Pagès, C., Rogard, M., Besson, M. J., Maldonado, R., & Caboche, J. (2001).  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-induced MAPK/ERK and Elk-1 activation in vivo depends on dopaminergic transmission. *European Journal of Neuroscience*, 14(2), 342-352.

✓ Valjent, E., Pascoli, V., Svenningsson, P., Paul, S., Enslin, H., Corvol, J. C., & Girault, J. A. (2005). Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(2), 491-496.

✓ Van Laere, K., Casteels, C., Lunsken, S., Goffin, K., Grachev, I. D., Bormans, G., & Vandenberghe, W. (2012). Regional changes in type 1 cannabinoid receptor availability in Parkinson's disease in vivo. *Neurobiology of Aging*, 33(3), 620-e1.

✓ Wang, H. L., Qi, J., Zhang, S., Wang, H., & Morales, M. (2015). Rewarding effects of optical stimulation of ventral tegmental area glutamatergic neurons. *Journal of Neuroscience*, 35(48), 15948-15954.

✓ Wang, H., & Lupica, C. R. (2014). Release of endogenous cannabinoids from ventral tegmental area dopamine neurons and the modulation of synaptic processes. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 52, 24-27.

✓ Ward, S. J., Lefever, T. W., Jackson, C., Tallarida, R. J., & Walker, E. A. (2008). Effects of a Cannabinoid1 receptor antagonist and Serotonin2C receptor agonist alone and in combination on motivation for palatable food: a dose-addition analysis study in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 325(2), 567-576.

✓ Washburn, M. S., Numberger, M., Zhang, S., & Dingledine, R. (1997). Differential dependence on GluR2 expression of three characteristic features of AMPA receptors. *Journal of Neuroscience*, 17(24), 9393-9406.

✓ Wilkinson, L. O., & Dourish, C. T. (1991). Serotonin receptor subtypes: basic and clinical aspects. *Serotonin and Animal Behaviour*. New York: Wiley-Liss.

✓ Wilson, R. I., & Nicoll, R. A. (2002). Endocannabinoid signaling in the brain. *Science*, 296(5568), 678-682.

- ✓ Wilson, R. I., Kunos, G., & Nicoll, R. A. (2001). Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus. *Neuron*, 31(3), 453-462.
- ✓ Wu, S. P., Lu, K. T., Chang, W. C., & Gean, P. W. (1999). Involvement of mitogen-activated protein kinase in hippocampal long-term potentiation. *Journal of Biomedical Science*, 6(6), 409-417.
- ✓ Xu, A. L., Zheng, G. Y., Ye, H. Y., Chen, X. D., & Jiang, Q. (2020). Characterization of astrocytes and microglial cells in the hippocampal CA1 region after transient focal cerebral ischemia in rats treated with Ilexonin A. *Neural Regeneration Research*, 15(1), 78.
- ✓ Xu, J. Y., & Chen, C. (2015). Endocannabinoids in synaptic plasticity and neuroprotection. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 21(2), 152–168.
- ✓ Xu, J. Y., Chen, R., Zhang, J., & Chen, C. (2010). Endocannabinoids differentially modulate synaptic plasticity in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *PLoS One*, 5(4), e10306.
- ✓ Xu, J. Y., Zhang, J., & Chen, C. (2012). Long-lasting potentiation of hippocampal synaptic transmission by direct cortical input is mediated via endocannabinoids. *The Journal of Physiology*, 590(10), 2305-2315.
- ✓ Yamada, J., Sugimoto, Y., & Horisaka, K. (1988). The behavioural effects of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT) in mice. *European Journal of Pharmacology*, 154(3), 299-304.
- ✓ Yamaguchi, T., Sheen, W., & Morales, M. (2007). Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area. *European Journal of Neuroscience*, 25(1), 106-118.
- ✓ Yu, A., & Lau, A. Y. (2018). Glutamate and Glycine Binding to the NMDA Receptor. *Structure (London, England: 1993)*, 26(7), 1035–1043.e2.
- ✓ Zhang, D., Hou, Q., Wang, M., Lin, A., Jarzylo, L., Navis, A., & Man, H. Y. (2009). Na, K-ATPase activity regulates AMPA receptor turnover through proteasome-mediated proteolysis. *Journal of Neuroscience*, 29(14), 4498-4511.
- ✓ Zhang, S., Qi, J., Li, X., Wang, H. L., Britt, J. P., Hoffman, A. F. & Morales, M. (2015). Dopaminergic and glutamatergic microdomains in a subset of rodent mesoaccumbens axons. *Nature Neuroscience*, 18(3), 386-392.
- ✓ Zheng, F., & Johnson, S. W. (2003). Dual modulation of gabaergic transmission by metabotropic glutamate receptors in rat ventral tegmental area. *Neuroscience*, 119(2), 453-460.