



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

SEDE SUR

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

**Participación del glutamato y la dopamina en la reversión de
la saciedad sexual inducida por los endocannabinoides 2-AG
y anandamida**

TESIS QUE PRESENTA

Lic. David Omar Hernández Aguilar

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN

NEUROFARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA EXPERIMENTAL

Directora de Tesis

Dra. Gabriela Rodríguez-Manzo

Este proyecto se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio 18, del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Sede Sur (Cinvestav-IPN, Sede Sur), bajo la dirección de la Dra. Gabriela Rodríguez Manzo.

Para la realización de este trabajo de tesis se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) a través de la beca de maestría No. 707306 / 589911 (CVU/Becario) para estudios a nivel nacional. El trabajo estuvo financiado por el proyecto Conacyt 220772.

DEDICADO A MIS PADRES, ALICIA Y DAVID.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, Dra. Gabriela Rodríguez Manzo, por darme una oportunidad en su equipo de trabajo, por su confianza en mí, por su cariño y apoyarme en todo momento. Gracias por su entrega, paciencia y dedicación en la elaboración de este trabajo, por sus enseñanzas y por ayudarme a aterrizar todas las ideas y datos que surgieron durante todo este tiempo en el que se realizó este trabajo. Gracias por darme la confianza para creer en mí mismo, lo que me ha ayudado a crecer mucho como profesionalista y persona. Muchas gracias por dejarme trabajar con usted, a quien considero una gran investigadora y un ejemplo a seguir, gracias por todo este tiempo.

A los miembros de mi jurado grandes personas e investigadores:

Al Dr. Alonso Fernández-Guasti, quien siempre ha tenido un trato amable y atento hacia conmigo. Gracias por darse el tiempo de leer mi trabajo y por sus acertados comentarios, reconociendo los aciertos y señalando todas las cosas que se podían mejorar, lo que acabó enriqueciendo mucho este trabajo.

Al Dr. René Garduño Gutiérrez, porque a pesar de que te hice leer mucho, te tomaste tu tiempo y mostraste una gran dedicación para que este trabajo se dirigiera a un buen puerto. Gracias por tus comentarios y por siempre impulsarme y guiarme a ver más allá de lo que tenía en mis manos, de corazón agradezco mucho tu ayuda.

A la Dra. Claudia Gómez Acevedo por todo su cariño durante todos estos años, porque como dice Mayra usted siempre va a ser nuestra mamá Académica, gracias por iniciarme en este hermoso mundo de la investigación y la academia. Dra. Claudia muchas gracias por apoyarme en todo momento, por confiar siempre en mí, por impulsarme a siempre buscar más y por todos los buenos momentos durante estos años. Siempre le voy a estar muy agradecido, he aprendido mucho de usted y siempre va a ser una gran inspiración en mi vida como profesionalista y como persona.

A todos los demás investigadores del CInvestav Sede Sur que he tenido el honor de conocer, gracias por sus enseñanzas y por ser siempre una inspiración para todos

nosotros, pues nos ha impulsado a ser unos mejores profesionistas. Especialmente gracias a la Dra. Carolina López Rubalcava, la Dra. Silvia Lorenia Cruz Martín del Campo, la Dra. Claudia González Espinosa y la Dra. Janet Murbartián Aguilar.

A las dos instituciones que hicieron todo esto posible al CINVESTAV y el Conacyt, al primero por abrirme sus puertas y permitirme seguir preparándome como profesionista y al segundo por brindar el apoyo económico para que pudiera seguir adelante. Les estaré por siempre inmensamente agradecido.

Un agradecimiento especial a mi alma máter, mi querida Universidad Nacional Autónoma de México, por ser mi casa durante más de una década y por seguir recibíendome con las puertas abiertas. Gracias a todas las escuelas y facultades en donde he estado, las llevo en mi corazón, me han hecho el profesionista y la persona que soy ahora y espero que algún día no muy lejano nos volvamos a encontrar. Gracias a mis queridos profesores: Germán Álvarez Díaz del León, Cesar Casasola Castro, Arturo Bouzas Riaño, José Fernando Peña Ortega, Azalea Reyes Aguilar, Beatriz Gómez González, Gerardo Ortiz Moncada, Olga Araceli Rojas Ramos, Maura Jazmín Ramírez Flores, Martha Lilia Escobar, Jacinto Santiago Mejía, Leticia Parra Gámez, Víctor Torres Flores, Hugo Fernández de Castro, Cecilia Verduzco Martínez, Laura Araceli Arias, Daniel Torres Pelayo, Salvador Espinosa Cruz, por mencionar algunos, porque la lista seguiría y seguiría, porque a pesar de que ya hayan pasado los años aún los llevo en mi memoria con mucho cariño y atesoro todas sus enseñanzas y consejos, los cuales me han hecho una mejor persona, espero que puedan sentirse orgulloso de su humilde alumno y hasta donde ha llegado, sin ustedes yo no lo hubiera logrado.

Y lo mismo podría decirle a todos mis profesores que no pertenecen a mi formación media superior y superior, porque ustedes también se merecen un reconocimiento por haber formado a ese pequeño niño y adolescente que hoy se ha convertido en un hombre de bien, gracias por la confianza y cariño, espero que después de todos estos años se puedan sentir orgullosos de mí y sepan que los recordare siempre con mucho cariño.

Un agradecimiento muy especial a Ma. de los Ángeles Ceja Gálvez, por su apoyo técnico para la realización de este trabajo. Muchas gracias por la paciencia y dedicación para enseñarme todo lo que sé ahora, me llevo muchos conocimientos y buenos momentos, de corazón muchas gracias Ángeles.

A mis compañeros del laboratorio 18, fue realmente un placer haberlos conocido, a mis queridas compañeras Estefanía, Valeria y Nash, además de a mis compañeros que no encuentran ahora con nosotros, pero con los que también tuve el placer de convivir a Pamela, Juan Luis y Ana. De corazón gracias por su apoyo y sus consejos para la realización de este trabajo y por todos los buenos momentos que hicieron tan disfrutable mi estancia en el laboratorio.

A las personas más importantes en mi vida, a mi mamá y a mi papá, Alicia y David, por no solamente darme la vida, también por impulsarme, encaminarme y apoyarme en cada uno de los aspectos de mi vida. Mamá y Papá ustedes son los mis pilares en la vida y a pesar de que podemos no estar siempre de acuerdo en todo, yo les tengo un enorme cariño y agradecimiento, siempre he tratado de que se sientan orgullosos de mí, sin ustedes yo no estaría donde estoy ahora, gracias por su esfuerzo y los sacrificios que han llegado a hacer, son los seres humanos más admirables que conozco y un gran ejemplo para mí. Siempre serán mis personas favoritas en el mundo, este trabajo se los dedico a ustedes, porque nunca dudaron en ningún momento en que lo conseguirá y siempre me apoyaron para seguir adelante. Los quiero con toda mi alma.

Quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a toda mi familia, a mis abuelos, a mis tíos, a mis tías, a mis primos, a mis primas y a mis sobrinos. Gracias por hacerme sentir parte de esta gran familia y por todos los buenos momentos. Sin querer menospreciar a nadie, un especial agradecimiento: a mi abuelita Lupe por su enorme cariño y siempre recibirme con los brazos abiertos. Dedicada con amor a mis abuelos Guadalupe, Nazario y María Luisa. A mis tíos Magdalena y Ángel, a mis primas Tere, Maru e Irma, además de sus esposos e hijos, por ser una parte muy importante en mi vida y estar siempre cerca. A mis tías y tíos Cruz, Blanca, María Luisa, Juan, Fernando,

Agustín y Guadalupe, además de sus esposos(as) e hijos, por siempre recibirme con cariño. A mis tíos Bertha y Eduardo, a mis primos Carmen, Virginia y Roberto, además de sus hijos, por su cariño.

Ahora bien, quiero agradecerles a mis grandes amigos, a quienes en todo momento llevo en mi corazón y que se han convertido en una familia para mí, a Pablo, Lisbeth, Mayra Itzel, Luis Alejandro, Mayra Gabriela, Omar, Daniel, Iván y Enrique. Ustedes han sido una parte clave en mi vida durante muchos años, especialmente durante estos dos últimos años, donde emprendí esta aventura. Sin ustedes tampoco lo hubiera logrado, porque me apoyaron siempre, estuvieron conmigo en las buenas y en las malas, porque a pesar de las dudas que tenía sobre mí, siempre creyeron en mí, en que lo lograría y por eso me dieron las fuerzas para seguir adelante. Verdaderamente soy muy afortunado en que la vida los haya puesto en mi camino, los amo con todo mi corazón.

A mis demás compañeros del CINVESTAV con quienes he pasado grandes momentos y ¿por qué no?, en ocasiones ratos estresantes, pero que gracias a ustedes se hicieron muy amenos. Gracias a Abigail, Isabel, Yarim, Mariana, Abraham, Héctor, Alberto por brindarme su amistad y porque también en más de una ocasión me ayudaron cuando lo necesitaba, atesoro mucho el tiempo juntos y puedo considerarlos unas grandes personas y profesionistas, además de llamarlos orgullosamente mis amigos. Gracias por todo pequeños. Los quiero mucho.

A mis queridos amigos tanto de la universidad como de la prepa, porque a pesar de los años que han pasado (no demasiado por supuesto), aún seguimos en contacto, siempre al pendiente de todos, deseándonos lo mejor en nuestras vidas. A Paulina, Jimena, Mali, Tania, Nadia, Daniela, Guadalupe, Claudia Elizabeth, Fernando, Víctor, Félix, Sergio, Laura, Carolina, Silvia, Mauricio, Miguel, Irving, Luis Lucio, Ana Michelle, Cecilia, Sandra, Aidé, Gabo, Octavio, Diego y a varios más, quienes no me vienen a la mente en estos momentos, gracias a todos, porque ustedes han formado parte importante de mi vida, porque pasamos muy gratos y buenos momentos durante nuestras épocas estudiantiles y porque saben que los quiero mucho y siempre podrán contar conmigo.

A aquellas personitas con las que sin quererlo la vida me ha topado, pero con quienes he pasado muy buenos y divertidos momentos, además de que han dejado una huella muy positiva en mi vida, saben que les he tomado mucho cariño y aprecio, gracias por brindarme su tiempo y por poder llamarlos mis amigos. A Edgar, José Luis, Fabián, Moy, Marco, Edgardo, Diego, Humberto, Alan, Iván, Izrael, Juan, Eduardo, Manuel, René, Logan, Luis Ángel, Alejandro, Allan, Rodolfo, Rodrigo, Sadd, Amy y mi tocayo David. Muchas gracias por sus buenos deseos. Les mando un gran abrazo.

A todas aquellas personas que han formado parte de mi historia y han dejado, de una u otra forma, una huella muy importante en mi vida. Incluyendo a aquellos que son su trabajo y obras han sido una gran influencia para mí. De corazón les doy las gracias, porque sin ustedes tampoco sería quien soy yo ahora.

Un agradecimiento especial a todo el personal del bioterio, de limpieza, de vigilancia y de administración del departamento de Farmacobiología del CINVESTAV Sede-Sur.

Antes de terminar, también le dedico este trabajo a Pepper y Max, mis queridos perros, que a pesar de ser seres de cuatro patas, eso no significa que en mi casa sean menos importantes, de hecho son parte esencial de mi familia. Gracias mis queridos niños por brindarme alegría y felicidad todos los días y por todo su cariño, los amo y siempre los llevo en mi corazón.

Y por último gracias a los nobles animales que dieron su tiempo, espacio y vida para la realización de este trabajo, del cual aprendí mucho.

Así pues, con mucho orgullo, felicidad y satisfacción, después de dos años de emprender esta gran aventura, puedo decirles muy orgullosamente: ¡**LO LOGRÉ!**

“Hasta la persona más pequeña, puede cambiar el curso del futuro”

J.R.R. Tolkien.

ÍNDICE

RESUMEN	I
Lista de abreviaturas y nomenclaturas	III
1. Introducción	1
1.1. Conducta sexual masculina	1
1.1.1. Conducta sexual de la rata macho	1
1.1.2. Saciedad sexual	5
1.2. Circuitos cerebrales dopaminérgicos involucrados en la regulación de la conducta sexual masculina	7
1.2.1. Generalidades del sistema mesolímbico dopaminérgico	8
1.2.2. El sistema mesolímbico dopaminérgico y la conducta sexual masculina	11
1.2.3. Glutamato, conducta sexual masculina y sistema mesolímbico dopaminérgico	13
1.3. Sistema endocannabinoide	16
1.3.1. Generalidades del sistema endocannabinoide	16
1.3.2. El sistema endocannabinoide y la conducta sexual masculina	21
1.4. El sistema endocannabinoide y el sistema mesolímbico dopaminérgico	24
2. Planteamiento del problema	25
3. Hipótesis	26
4. Objetivos	26
- Objetivos Generales	26
- Objetivos Específicos	26
5. Materiales y métodos	27
5.1. Animales	27
5.2. Registro de la conducta sexual	27

5.3. Paradigma de saciedad sexual	28
5.4. Prueba de conducta ambulatoria espontánea	28
5.5. Fármacos	28
5.6. Cirugía estereotáxica y administración de fármacos	29
5.7. Verificación del sitio de implantación	30
5.8. Diseño experimental	30
- Objetivos específicos 1 y 2	30
- Objetivos específicos 3 – 5	31
- Objetivo específico 6	33
5.9. Análisis estadístico	34
6. Resultados	35
6.1. Interacción 2-AG y sistema dopaminérgico	35
6.2. Interacción eCN y sistema glutamatérgico	37
6.3. Interacción entre el 2-AG y sistema glutamatérgico en el ATV	43
7. Discusión	46
7.1. Interacción 2-AG y sistema dopaminérgico	46
7.2. Interacción eCN y sistema glutamatérgico	51
7.3. Interacción entre el 2-AG y el sistema glutamatérgico del ATV	56
8. Conclusiones	57
9. Perspectivas	58
10. Referencias	59

RESUMEN

El sistema mesocorticolímbico dopaminérgico (SMD) está compuesto de neuronas dopaminérgicas (DA) que se originan en el área tegmental ventral (ATV) y proyectan al núcleo accumbens (NAcc) y a la corteza prefrontal principalmente. El SMD participa en el procesamiento de los componentes motivacionales y reforzantes de la cópula en ratas macho. Durante una sesión de cópula *ad libitum*, un macho eyaculará repetidamente hasta alcanzar la saciedad sexual, que es un fenómeno de inhibición de la conducta sexual de larga duración (72h). La cópula activa al SMD aumentando la liberación de dopamina en el NAcc y los estímulos recompensantes promueven la liberación de glutamato en el ATV, mismo que estimula a las neuronas DA. Por otro lado, la activación repetida del SMD promueve la síntesis y liberación de endocannabinoides (eCN) de los somas de las neuronas DA, los cuales modulan la actividad del SMD a través de inhibir la liberación de neurotransmisor de las terminales GABAérgicas y glutamatérgicas del ATV. Se ha demostrado que dosis bajas de antagonistas de receptores glutamatérgicos tipo NMDA, AMPA y mGluR5 revierten la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas. Del mismo modo, dosis bajas de los eCN anandamida (AEA) y 2-araquidonilglicerol (2-AG) revierten la saciedad sexual y se ha demostrado que la AEA interactúa con el sistema DA en este efecto. Este trabajo tuvo dos objetivos generales: el primero fue determinar si el 2-AG también interactúa con la dopamina para revertir la saciedad sexual. Para ello, se utilizaron grupos independientes de ratas sexualmente saciadas (n=8-12) a los que, a las 24h post-saciedad, se les co-administró, por vía sistémica dosis sub-efectivas del agonista dopaminérgico apomorfina y del eCN 2-AG o una dosis efectiva de 2-AG más el antagonista dopaminérgico haloperidol, a una dosis que no afecta la cópula. En ambos casos los resultados muestran que el 2-AG interactúa con la dopamina para revertir la saciedad sexual, al sinergizar con el agonista DA para producir sus efectos, que se bloquean con el antagonista DA. El segundo objetivo fue determinar si ambos eCN interactúan con el glutamato para revertir la saciedad sexual. Para esto, en grupos independientes de ratas sexualmente saciadas (n=8-10), se probaron combinaciones de dosis sub-efectivas de AEA o de 2-AG, administradas por vía sistémica a las 24h post-saciedad, junto con dosis sub-efectivas del antagonista NMDA ketamina o del antagonista de receptores mGluR5, MPEP. Los resultados muestran que en todos los casos los eCNs sinergizaron con los antagonistas glutamatérgicos para revertir la saciedad sexual. Para establecer si esto ocurría en el ATV, se administró a ratas macho, sexualmente saciadas, una dosis efectiva de 2-AG por vía sistémica y, por vía intra-ATV, el agonista de receptores glutamatérgicos mGluR5, CHPG. Los resultados mostraron que el efecto facilitador del 2-AG sobre la cópula de animales sexualmente exhaustos se bloquea con la activación de receptores glutamatérgicos mGluR5 en el ATV. Estos datos nos permiten concluir que los eCN interactúan tanto con el sistema dopaminérgico como con el sistema glutamatérgico para revertir la inhibición sexual característica de la saciedad y que la interacción con el sistema glutamatérgico tiene lugar en el ATV.

Abstract

The mesocorticolimbic dopaminergic system (MDS) is composed by dopaminergic (DA) neurons originating in the ventral tegmental area (VTA) and mainly projecting to the nucleus accumbens (NAcc) and the prefrontal cortex. The MDS participates in the processing of the motivational component and reinforcing properties of male rat sexual behavior. If allowed to copulate *ad libitum*, a male rat will ejaculate repeatedly until becoming sexually satiated and this will be followed by a long lasting (72h) sexual behavior inhibitory period called sexual satiety. Copulation activates the MDS thereby increasing NAcc DA release, while rewarding stimuli promote glutamate release in the VTA, which stimulates the DA neurons of the MDS. Besides, repeated activation of the MDS promotes the synthesis and release of endocannabinoids (eCN) from the somas of the DA neurons, which also modulate the activity of the circuit by inhibiting neurotransmitter release from GABAergic and glutamatergic terminals at the VTA. It has been shown that low doses of antagonists for NMDA, AMPA and mGluR5 glutamatergic receptors reverse the sexual inhibition of sexually satiated rats. Similarly, low doses of the eCN anandamide (AEA) and 2-arachidonylglycerol (2-AG) reverse sexual satiety and it was shown that AEA interacts with the DA system in this effect. This work had two general objectives: the first was to determine if 2-AG also interacts with dopamine to reverse sexual satiety. To this aim, independent groups of sexually satiated rats ($n = 8-12$) were co-administered, 24 h after satiety, with sub-effective doses of the dopamine receptor agonist apomorphine and the eCN 2-AG or with an effective dose of 2-AG plus the dopaminergic antagonist haloperidol, at a dose not affecting copulation. Results showed that 2-AG interacted with dopamine to reverse sexual satiety, by synergizing with the DA agonist to produce its effects. Besides, the DA antagonist blocked 2-AG-induced reversal of sexual satiety. The second objective was to determine if both eCNs interacted with glutamate to reverse sexual satiety. To this end, combinations of sub-effective doses of AEA or 2-AG were systemically administered to independent groups of sexually satiated rats ($n = 8-10$), in conjunction with sub-effective doses of the NMDA receptor antagonist, ketamine, or the mGluR5 receptor antagonist, MPEP, 24 h after satiety. Results showed that in all cases, the eCNs synergized with glutamatergic antagonists to reverse sexual satiety. To establish if this occurred at the VTA, sexually satiated male rats, received systemically an effective dose of 2-AG together with a low dose of the glutamatergic mGluR5 receptor agonist, CHPG, directly into the VTA. Results showed that the facilitative effect of 2-AG on copulation of sexually exhausted animals was blocked by the intra-VTA glutamatergic agonist. These data allow us to conclude that eCNs interact with both the dopaminergic and the glutamatergic systems to reverse the sexual inhibition that characterizes sexual satiety and that the interaction with the glutamatergic system occurs at the VTA

Lista de abreviaturas y nomenclaturas

2-AG: 2-araquidonilglicerol

µg/kg: microgramo por kilogramo

µm: micrómetro

AA: ácido araquidónico

ABHD4: alfa beta hidrolasa 4

ABDH6: alfa beta hidrolasa 6

ABDH12: alfa beta hidrolasa 12

AEA: anandamida

AM251: antagonista del receptor cannabinoide CB1

AMIG: amígdala

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

AMPA: ácido amino – 3 – hidroxil – 4 – metil – 4 – isoxazolpropiónico (agonista del receptor glutamatérgico receptor AMPA)

APOm: área pre-óptica media

ATV: área tegmental ventral

BNST: núcleo del techo de la estría terminal

CB1: receptor cannabinoide tipo 1

CB2: receptor cannabinoide tipo 2

CHPG: 2 – cloro – 5- hidroxifenilglicina (agonista glutamatérgico mGluR5)

CNQX: 6 – ciano – 7 – nitroquinoxalina – 2,3 – olione (antagonista glutamatérgico AMPA)

COX-2: prostaglandina-endoperóxido sintasa 2

DA: dopamina

DAG- L: diacilglicerol lipasa

DSE: supresión de la excitación inducida por despolarización

DSI: supresión de la inhibición inducida por despolarización

E: eyaculaciones

eCN: endocannabinoides

EPSCs: potenciales postsinápticos excitatorios

FAAH: enzima amino hidrolasa de ácidos grasos

FLAT: transportador específico de eCN
GABA: Acido γ - aminobutírico
GABA-A: Receptor ionotrópico GABAérgico tipo A
GDE1: glicerolfosfodiesterasa
Gi: proteína G inhibidora de AMPc
Glu: glutamato
GP-AEA: glicerol-fosfoanandamida
GPRC: receptor acoplado a proteína G
Gq: proteína G activadora de fosfolipasa C
Gs: proteína G activadora de AMPc
I: intromisión
i.p.: intraperitoneal
IPE: intervalo post-eyaculatorio
IPSCs: potenciales postsinápticos inhibitorios
L-DOPA: levo-dopa
LDTg: núcleo tegmental dorsolateral
LE: latencia de eyaculación
LH: hipotálamo lateral
LHb: habénula lateral
LI: latencia de intromisión
LM: latencia de monta
LOX: lipooxigenasa
LTD: depresión a largo plazo
LTP: potenciación a largo plazo
Lyso-IP: lyso – fosfatidil-inositol
Lyso-NAPE: lyso - N – araquidonilfosfatidiletanolamida
Lyso-PLD: fosfolipasa D específica para Lyso-NAPE
M: monta
MGL: monoacilglicerol lipasa
mg/kg: miligramo por kilogramo
mGluR5: receptor glutamatérgico metabotrópico tipo 5

MPEP: 2-metil-6-(feniletíl) piridina (antagonista glutamatérgico del receptor mGluR5)

MSN: neurona espinosa media

NAAA: N-acyletanolamina – amidasa ácida hidrolizada

NAcc: núcleo accumbens

NaCl: cloruro de sodio

NAPE: N – araquidonilfosfatidiletanolamida

NAPE – PLD: fosfolipasa D específica para NAPE

NAT: N – acil transferasa

nM: nanomolar

NMDA: N-metil-D-aspartato (agonista glutamatérgico del receptor NMDA)

P450: citocromo P450

pAEA: anandamida fosforilada

PKA: proteína cinasa A

PLA: fosfolipasa A

PLC: fosfolipasa C

Pi: fosfatidil-inositol

PPAR: receptor nuclear

PRA: periodo refractario absoluto

PRR: periodo refractario relativo

PTPN22: proteína tirosina fosfatasa N22

PVN: núcleo paraventricular

RMTg: núcleo tegmental rostromedial

SKF38393: agonista específico de receptores D1 – Like

SMD: sistema mesolímbico dopaminérgico

SN: sustancia nigra

SNC: sistema nervioso central

SON: núcleo supraóptico

TH: tirosina hidroxilasa

TRPV1: receptor de potencial transitorio vanilloide1

1. INTRODUCCIÓN

La saciedad sexual es un fenómeno de inhibición de la conducta sexual masculina, de larga duración, en el que el sistema mesolímbico dopaminérgico (SMD) parece jugar un papel central. La actividad del circuito mesolímbico está regulada por aferentes GABAérgicas y glutamatérgicas, tanto locales como de origen extrínseco. La liberación de ácido γ -aminobutírico (GABA) y glutamato (Glu) en este circuito es, a su vez, modulada por el sistema endocannabinoide. En esta tesis se analiza la posibilidad de que el sistema endocannabinoide interactúe con los sistemas glutamatérgico y dopaminérgico del circuito mesolímbico para la reversión de la inhibición sexual que caracteriza a la saciedad sexual en la rata macho.

1.1. Conducta sexual masculina.

La reproducción es una función esencial en los organismos vivos. La gran mayoría de los organismos eucariontes se reproducen de manera sexual, lo que permite la recombinación del material genético de dos organismos de la misma especie y promueve la variabilidad genética. Todos los mamíferos, incluyendo el hombre se reproducen sexualmente, y por lo tanto presentan conducta sexual (Curtis & Barnes, 1993). Así, la conducta sexual es una de las expresiones conductuales más importantes en estas especies y constituye un aspecto central en la vida de los mamíferos.

1.1.1. Conducta sexual de la rata macho.

La conducta sexual de la rata macho está genéticamente determinada, es altamente estereotipada e implica una interacción social entre individuos; además es altamente recompensante, lo cual asegura su repetición y contribuye a la preservación de la especie (Hull & Rodríguez-Manzo, 2009; Kelley & Berridge, 2002).

La expresión de la conducta sexual en la rata macho se puede dividir en dos fases: la fase apetitiva y la fase consumatoria. En la fase apetitiva, el macho despliega conductas pre-copulatorias, como el cortejo, que tienen como fin iniciar la búsqueda de una hembra sexualmente receptiva para iniciar la interacción sexual con la pareja (Sachs & Meisel, 1988). En esta fase, a través de la exploración anogenital el macho puede evaluar la probabilidad para el apareamiento con la hembra (Hull et al., 2002).

Tras un primer acercamiento con una hembra sexualmente receptiva, la rata macho inicia la fase consumatoria (Sachs & Meisel, 1988). Esta fase está constituida por la conducta copulatoria, la cual a su vez está conformada por tres diferentes conductas motoras: la conducta de monta, la conducta de intromisión y la conducta de eyaculación (Fig. 1) (Hull et al., 2002), las cuales se describen a continuación:

Conducta de monta (M): el macho eleva su cuerpo sobre sus cuartos traseros, y monta a la hembra colocando sus patas delanteras en sus flancos traseros, realiza una serie de movimientos pélvicos anteroposteriores superficiales, sin inserción del pene en la vagina de la hembra. El macho al terminar desmonta a la hembra de forma lenta (Hull & Rodríguez-Manzo, 2017; Beyer et al., 1981) (Fig. 1-A).

Conducta de intromisión (I): el macho realiza una monta que es seguida por un movimiento pélvico prolongado, el cuál es un indicador de la inserción del pene en la vagina de la hembra, cuando ésta adopta la postura de lordosis (arqueamiento de la columna vertebral). Posteriormente el macho desmonta a la hembra de manera abrupta y en reversa, que es seguido de acicalamiento genital del macho (Hull & Rodríguez-Manzo, 2017; Beyer et al., 1981) (Fig. 1-B)

Conducta de eyaculación (E): consiste en una intromisión que termina con un movimiento pélvico profundo, el cual se mantiene por varios segundos y coincide con la emisión seminal, que no es más que la salida del semen a través del meato uretral que ocurre gracias a los movimientos espasmódicos de los músculos esqueléticos y estriados del periné (incluyendo al isquiocavernoso, el bulboesponjoso y el esfínter del ano). Durante la conducta de eyaculación la rata macho levanta su torso y sus patas delanteras, para posteriormente desmontar a la hembra suavemente o en ocasiones caer de lado. Al término de esta conducta, el macho presenta acicalamiento genital de mayor duración en comparación con el que se presenta después de la conducta de intromisión (Hull & Rodríguez-Manzo, 2017; Beyer et al., 1981) (Fig. 1-C).

El patrón copulatorio de la rata macho es una secuencia estereotipada de montas e intromisiones intercaladas entre sí, que culminan con la eyaculación (Fig. 2)



Figura 1. Conductas copulatorias de la rata macho: A) conducta de monta, B) conducta de intromisión y C) conducta de eyaculación

Después de la eyaculación se presenta un periodo de inactividad sexual, con una duración de 5-10 minutos después de una primera eyaculación, en el que la rata macho es refractaria a la estimulación sexual y durante el cual presenta muy poca actividad locomotora y se mantiene alejado de la hembra. A este periodo se le denomina intervalo post-eyaculatorio (IPE). El IPE está conformado por dos fases: el periodo refractario absoluto (PRA) y el periodo refractario relativo (PRR). EL PRA abarca el 75% inicial de la duración total del IPE y durante éste, el macho emite vocalizaciones ultrasónicas de 22 kHz (Barfield & Geyer, 1975) y no es capaz de reiniciar la cópula, ni siquiera si es estimulado intensamente (Hull et al., 2002). EL PRR ocupa la parte final del IPE, que corresponde al último 25% de su duración. Durante este periodo la aplicación de un estímulo doloroso (como choques eléctricos de baja intensidad) o la introducción de una nueva hembra receptiva pueden hacer que el macho reinicie la cópula (Hull et al., 2002). En el PRR no están presentes las vocalizaciones ultrasónicas (Barfield & Geyer, 1975).

Se le llama serie eyaculatoria a la serie de eventos que transcurren entre una primera intromisión y una eyaculación, cuando se incluye al IPE, se le llama serie copulatoria (Fig. 2). Las conductas motoras que integran el patrón copulatorio de la rata macho son constantes en su frecuencia y latencia de aparición, con lo cual, son fácilmente de identificar y cuantificar. Esto es lo que ha permitido establecer diversos parámetros, los cuales pueden clasificarse en temporales y numéricos, los cuáles son utilizados para evaluar experimentalmente la conducta sexual masculina (Sachs & Barfield, 1976; Larsson & Ahlenius, 1999; Hull & Rodríguez-Manzo, 2009).

Parámetros temporales de la cópula:

Latencia de monta (LM): tiempo que pasa entre el inicio del contacto del macho con una hembra receptiva y la aparición de la primera monta de la serie

Latencia de intromisión (LI): tiempo que transcurre entre que el macho y la hembra receptiva entran en contacto y que se presenta la primera intromisión

Latencia de eyaculación (LE): tiempo que transcurre desde la primera intromisión realizada por el macho hasta que se presenta la eyaculación

Intervalo post-eyaculatorio (IPE): tiempo que transcurre entre la eyaculación y el inicio de una nueva serie eyaculatoria, indicado por la aparición de la primera intromisión de la siguiente serie.

Parámetros numéricos de la cópula:

Número de montas (M): número de montas que se presentan antes de la eyaculación

Número de intromisiones (I): número de intromisiones que preceden a la eyaculación.

Número de eyaculaciones (E): número de eyaculaciones que se presentan en un tiempo de observación determinado.

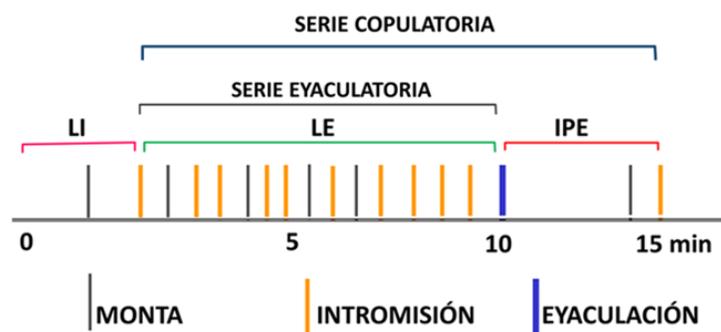


Figura 2. Representación esquemática del patrón copulatorio de la rata macho y de los parámetros que se usan para evaluarla.

La medición de la conducta sexual ha permitido identificar la existencia de diferentes sub-poblaciones de ratas macho, en términos de su conducta sexual. Para esta tesis, nos centraremos en los machos sexualmente expertos, un modelo de conducta sexual óptima y que se refiere a aquellos machos que copulan desde la primera o segunda exposición a una hembra sexualmente receptiva y logran un patrón copulatorio estable, presentando latencias de eyaculación menores a 15 minutos.

1.1.2. Saciedad sexual

En 1956 el fenómeno de saciedad sexual fue descrito por primera vez, de manera simultánea, por Beach & Jordan y por Larsson, quienes centraron su atención en la capacidad copulatoria de los machos. El fenómeno de la saciedad sexual es definido como el establecimiento natural de un periodo de inhibición de la conducta sexual, de larga duración, que se presenta como resultado de eyaculaciones repetidas durante una sesión de cópula *ad libitum* (Beach & Jordan, 1956; Larsson, 1956; Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1994).

Este fenómeno de inhibición sexual, permanece bien establecido por un periodo de hasta 72 horas; debido a que a las 96 horas post-saciedad todos los animales son capaces de eyacular al menos una vez y de reiniciar la cópula después de esa eyaculación. Sin embargo, para que los animales sexualmente exhaustos recuperen su capacidad eyaculatoria inicial, se requieren de al menos un periodo de 15 días de inactividad sexual (Rodríguez-Manzo et al, 2011).

El fenómeno de saciedad sexual se ha abordado desde diversas perspectivas, con el fin de estudiar y describir su desarrollo, mantenimiento y recuperación, así como la influencia que pueden tener factores internos y externos en su establecimiento.

El paradigma experimental para el desarrollo de la saciedad sexual que estandarizaron los doctores Rodríguez-Manzo y Fernández-Guasti consiste en permitir a ratas macho sexualmente expertas copular *ad libitum* con una misma hembra sexualmente receptiva. Los machos realizan un promedio de 7 series eyaculatorias sucesivas antes de llegar a la saciedad sexual. El criterio utilizado para determinar que un macho alcanzó la saciedad sexual es que trascurren 90 minutos desde la última eyaculación, sin que el macho vuelva a eyacular. Este criterio se cumple para todos las ratas macho en un periodo de interacción sexual de 4 horas, independientemente de la capacidad eyaculatoria individual de cada animal. Se observó que durante las series eyaculatorias sucesivas que tienen lugar en una sesión de cópula hasta la saciedad, el número de montas no se modifica, el número de intromisiones disminuye progresivamente, la latencia de eyaculación tiende a aumentar y el IPE incrementa su duración con cada eyaculación, siguiendo un perfil exponencial (Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1994). A las 24 horas post-saciedad, se encontró que la inhibición

sexual se expresa de dos maneras distintas: 2/3 partes de la población de machos sexualmente exhaustos no presenta conducta sexual al ser expuesta a una hembra sexualmente receptiva y la otra 1/3 parte realiza una serie eyaculatoria, después de la cual ya no reinicia la cópula. Este comportamiento se mantiene estable hasta por 72 horas (Fig. 3) (Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1994).

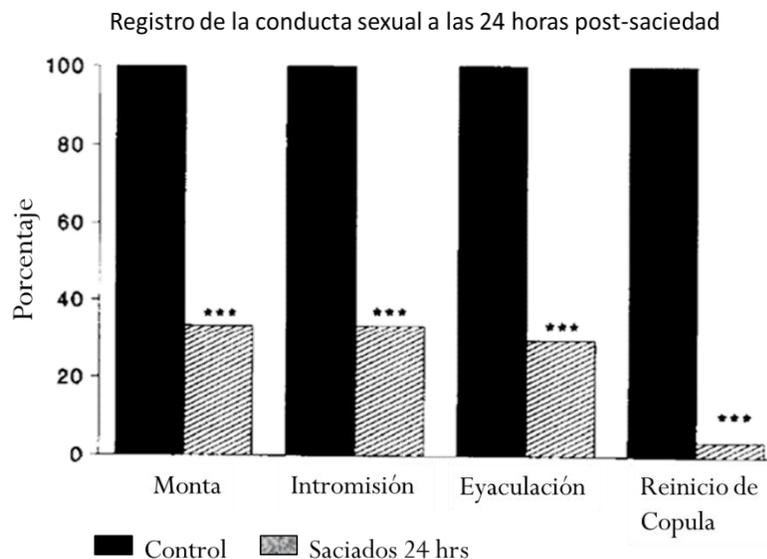


Figura 3. Porcentaje de ratas saciadas que presenta las diferentes respuestas sexuales a las 24 horas post-saciedad. Las barras negras representan al grupo control de ratas macho sexualmente expertas, mientras que las barras achuradas representan a los animales saciados. Se muestra que un tercio de estos últimos es capaz de copular hasta la eyaculación, pero no reinicia la cópula (Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1994)

A través de múltiples manipulaciones farmacológicas se ha establecido que en el fenómeno de saciedad sexual están involucrados diferentes sistemas de neurotransmisión, como son los sistemas noradrenérgico y serotoninérgico (Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1994), el sistema glutamatérgico (Rodríguez-Manzo, 2015), el sistema dopaminérgico (Mas et al., 1995; Rodríguez-Manzo, 1999) el sistema opioide endógeno (Pfaus & Gorzalka, 1987; Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1995; Garduño-Gutiérrez et al., 2013), el sistema endocannabinoide (Canseco-Alba & Rodríguez-Manzo, 2014) y el sistema GABAérgico (Rodríguez-Manzo & Canseco-Alba, 2017).

1.2 Circuitos cerebrales dopaminérgicos involucrados en la regulación de la conducta sexual masculina

La dopamina (DA) tiene un papel importante en la expresión de la conducta sexual masculina. La síntesis de DA tiene lugar en las terminales de las neuronas dopaminérgicas a través de dos pasos biosintéticos. En primer lugar el aminoácido tirosina, el cual se obtiene de la dieta, es transformado en L-DOPA por acción de la enzima tirosina hidroxilasa (TH). El segundo paso convierte la L-DOPA en DA por acción de la L-DOPA descarboxilasa (Freund et al, 1984). La DA actúa a través de dos familias de receptores: los receptores D1-like (que incluye a los subtipos D1 y D5) y los receptores D2-like (que incluye a los subtipos D2, D3 y D4). Mientras que la familia D1-like está acoplada a proteínas Gs (activando a la adenilato-ciclasa, promoviendo la producción de AMPc), la familia D2-like está acoplada a proteínas Gi (inhibiendo a la adenilato-ciclasa y a su vez la producción de AMPc) (Missale et. al, 1998).

Debido a la importancia de la dopamina en la conducta sexual masculina, se ha propuesto el llamado modelo de control central (Hull, 1999) que plantea la participación de 3 circuitos dopaminérgicos para la integración de la conducta sexual masculina: la vía incertohipotalámica, la vía nigroestriatal y la vía mesolímbica (Fig. 4)

La vía incertohipotalámica se origina en la zona incerta subtalámica A14, situada entre el fascículo talámico y el fascículo lenticular, y envía sus axones a diversos núcleos hipotalámicos como el núcleo paraventricular (PVN), el núcleo supraóptico (SON) y el área preóptica media (APOm) (Fig. 4) (Hull et al, 1999). El APOm tiene el papel más importante, pues es una región involucrada en la actividad endocrina y en la regulación de las respuestas genitales de erección y eyaculación; además, tiene un papel esencial en la regulación de la expresión de la conducta sexual masculina de todas las especies de vertebrados (Hull & Rodríguez-Manzo, 2017).

La vía nigroestriatal consiste de neuronas dopaminérgicas que se originan en la zona compacta de la sustancia nigra (SN) y que envían sus axones a los núcleos caudado y putamen del estriado (Fig, 4). Esta vía está involucrada en el control de los aspectos motores y sensoriales de la cópula (Hull & Rodríguez– Manzo, 2017).

En este trabajo nos centraremos en la vía mesolímbica, que llamaremos sistema mesolímbico dopaminérgico (SMD). El SMD está conformado por neuronas

dopaminérgicas cuyos cuerpos neuronales están localizados en el área tegmental ventral (ATV) y envían sus proyecciones al núcleo accumbens (NAcc), la corteza prefrontal (CPF) y la amígdala (AMIG) principalmente (Fig. 4). El circuito formado por las neuronas DA del ATV y las neuronas del NAcc con las que hacen sinapsis, llamadas neuronas espinosas medias (MSN) que son de naturaleza GABAérgica, es de vital importancia para el procesamiento de la motivación que producen los estímulos recompensantes, es decir, esta vía se encarga del reconocimiento de estímulos recompensantes y de iniciar las conductas que lleven a su obtención (Russo & Nestler, 2013).

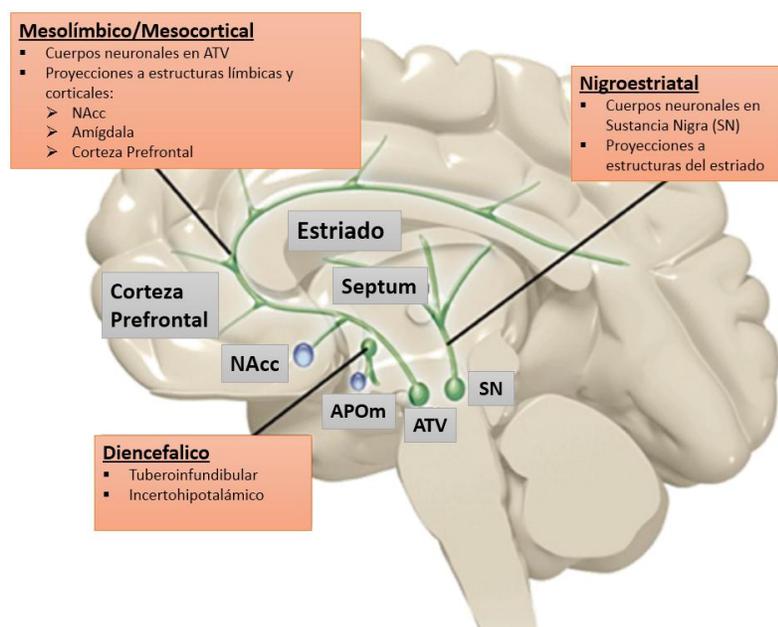


Figura 4. Esquema de los 3 circuitos dopaminérgicos que conforman el llamado modelo de control central de la conducta sexual:

- vía incertohipotálamica
- vía nigroestriatal
- vía mesolímbica.

1.2.1 Generalidades del Sistema Mesolímbico Dopaminérgico (SMD)

El SMD está involucrado en el procesamiento de conductas recompensantes, que son aquéllas cuya ejecución tiene consecuencias positivas para el organismo, con una alta probabilidad para repetirse y convirtiéndose con ello en reforzadores positivos. La conducta de ingesta de alimento y la conducta sexual forman parte del repertorio conductual innato de los organismos y ambas son conductas recompensantes en sí mismas, con lo que se les considera recompensas naturales que han asegurado la sobrevivencia de las especies (Domjan, 1999; Reeve, 1999; Kerry & Berridge, 2002; Sokolowski & Corbin, 2012).

Por otro lado, el SMD también está involucrado en las conductas relacionadas con el consumo de drogas de abuso, sustancias que actúan en el mismo circuito de las recompensas naturales y lo “secuestran” causándole neuroadaptaciones de largo plazo que pueden derivar en conductas adictivas (Berridge & Robinson, 1998; Reeve, 1999; Berridge, 2004; Melis et al., 2012).

El ATV está formado de neuronas DA que reciben influencia tanto GABAérgica como glutamatérgica de otras estructuras cerebrales (Gardner, 2002). Las proyecciones glutamatérgicas surgen principalmente de la corteza prefrontal y del núcleo del lecho de la estría terminal (BNST), además de los núcleos glutamatérgicos/colinérgicos del núcleo pedunculopontino y el núcleo laterodorsal tegmental (Melis et al, 2012). El ATV también recibe entradas glutamatérgicas del núcleo tegmental dorsal lateral (LDTg), habénula lateral (LHb) e hipotálamo lateral (LH) (Russo & Nestler, 2013). Por su parte, las proyecciones inhibitorias surgen de interneuronas GABAérgicas locales en el ATV, que hacen sinapsis con las neuronas DA (Grace & Onn, 1989; Bayer & Pickel, 1991; Omelchenko & Sesack, 2009) y del núcleo accumbens (Marinelli et al., 2006; Sesack & Grace, 2010; Morikawa & Paladini, 2011) (Fig. 5). Además existe una aferencia inhibitoria importante proveniente del núcleo tegmental rostromedial (RMTg), también llamado cola del ATV, el cual está formado por neuronas GABAérgicas que tienen la función de ejercer un “freno maestro” sobre las neuronas DA (Jhou et al., 2009).

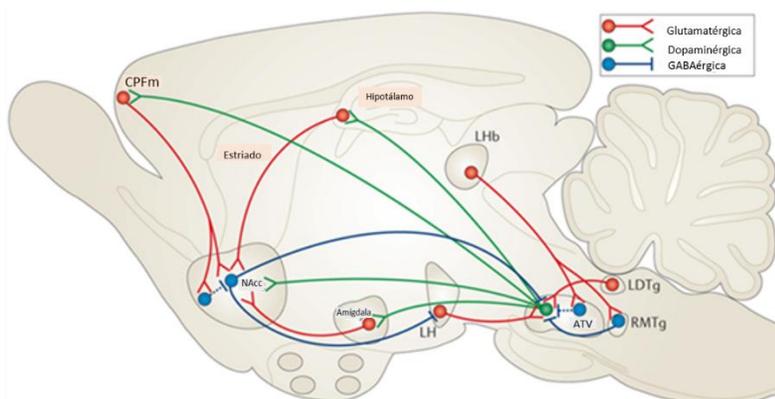


Figura 5. Esquema del sistema mesolímbico dopaminérgico conformado por el área tegmental ventral (VTA) y el núcleo accumbens (NAcc) (Russo & Nestler, 2013).

Diversos estudios tanto *in vivo* como *in vitro* que han investigado las propiedades electrofisiológicas de las neuronas DA del SNC, incluyendo las neuronas DA del ATV, demostraron que estas células tienen una actividad intrínseca de marcapasos (Morikawa

& Paladini, 2011). La actividad de las neuronas DA del ATV puede presentar diferentes estados de activación, que están en función de las propiedades intrínsecas de las neuronas, las influencias aferentes GABAérgica y glutamatérgica y de los mensajeros retrógrados liberados por las propias neuronas DA (Melis et al., 2012). Se ha reportado que las interneuronas GABAérgicas del ATV ejercen una inhibición tónica sobre las neuronas dopaminérgicas, que es la responsable de que estas últimas mantengan una liberación tónica de DA en el NAcc (Fig. 6a) (Lobb et al, 2011). Cuando se presenta un estímulo recompensante, se interrumpe esta influencia inhibitoria por la acción de opioides endógenos, lo que permite que las neuronas dopaminérgicas comiencen a liberar DA de manera fásica en el NAcc (Johnson & North, 1992; Balfour et al., 2004). Adicionalmente se ha observado que las terminales glutamatérgicas extrínsecas al ATV, provenientes principalmente de la CPF, liberan glutamato ante la presencia de un estímulo recompensante, y éste actúa sobre las neuronas dopaminérgicas facilitando la liberación fásica de DA en el NAcc (Fig. 6b) (Balfour et al., 2006; Russo & Nestler, 2013). Por lo tanto, los diferentes tipos de liberación de DA de las neuronas DA son el resultado del equilibrio entre los estímulos excitatorios e inhibitorios que interactúan con las corrientes intrínsecas, tipo marcapaso, de las neuronas DA (Melis et al., 2012).

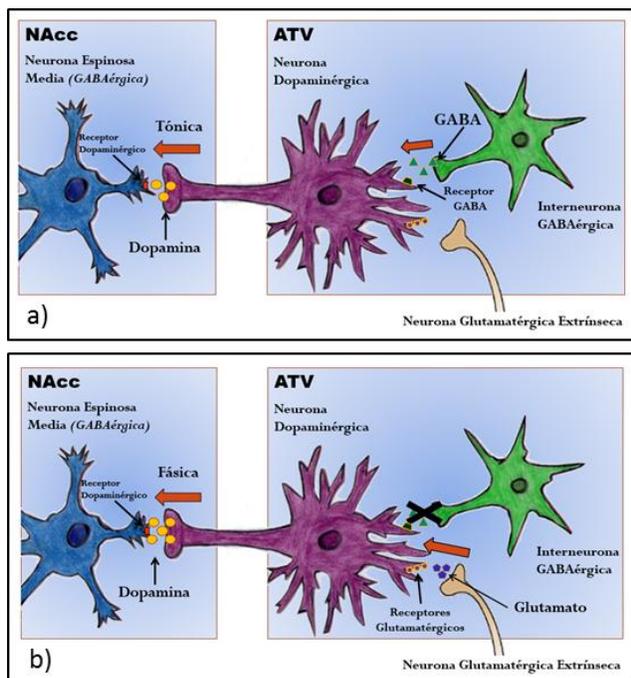


Figura 6. Actividad de las neuronas dopaminérgicas del SMD: a) en ausencia de un estímulo recompensante, la interneurona GABAérgica ejerce un tono inhibitorio sobre las neuronas dopaminérgicas y éstas liberan DA de forma tónica, b) en presencia de un estímulo recompensante se cancela el tono inhibitorio de la neurona GABAérgica y las terminales glutamatérgicas se activan liberando glutamato que estimula a la neurona dopaminérgica. Estos 2 eventos hacen que la liberación de DA se vuelva fásica (imagen modificada de Canseco-Alba, 2016).

1.2.2 El Sistema Mesolímbico Dopaminérgico y la conducta sexual masculina

La conducta sexual masculina incrementa la actividad de las neuronas dopaminérgicas del ATV, lo cual a su vez aumenta la liberación de DA en el NAcc. Estudios de microdiálisis revelan que este incremento ocurre tanto en respuesta a la presencia de una hembra sexualmente receptiva detrás de una barrera, como durante la interacción sexual con ella (Pfaus et al, 1990). Por otro lado, estudios con la proteína Fos, un marcador de actividad neuronal, también demuestran que las neuronas dopaminérgicas del SMD se activan durante la cópula o en respuesta a la exposición a estímulos ambientales sexuales (Balfour et al, 2004). Por otro lado, la DA facilita la expresión de la conducta sexual de la rata macho, pues la administración sistémica de agonistas dopaminérgicos facilita la cópula (Hull & Rodríguez-Manzo, 2017).

En pacientes con la enfermedad de Parkinson se ha observado que la administración del precursor de la dopamina, la L-DOPA, incrementa tanto la libido como la potencia sexual, lo cual no tiene relación con el mejoramiento de la función locomotora (Jenkins & Groh, 1970; Mones, Elizan, & Siegel, 1970; Brown, et al. 1978).

Experimentalmente, la administración sistémica de agonistas de receptores dopaminérgicos facilita la cópula tanto en ratas macho sexualmente expertas (Domínguez & Hull, 2005) como en ratas copuladoras lentas (Tagliamonte et al, 1974), además de restaurar parcialmente la cópula en machos castrados (Scaletta & Hull, 1990). Hablando específicamente de las familias de receptores dopaminérgicos, los agonistas de receptores de la familia D2-Like facilitan la cópula en ratas sexualmente expertas, al disminuir el número de intromisiones y la latencia de eyaculación, aunque esto no se ha observado en ratas sexualmente inactivas (Ferrari & Giuliani, 1995). En cambio, los agonistas de receptores de la familia D1-Like incrementan la motivación sexual en machos sexualmente expertos (Beck et al, 2002). Por otro lado, la administración sistémica de antagonistas dopaminérgicos deteriora la conducta sexual de animales sexualmente expertos (Ahlenius & Larsson, 1990) e inhibe aspectos relacionados con la motivación sexual en ratas sexualmente naïve (López & Ettenberg, 2001).

Durante la cópula hasta la saciedad, el SMD es activado constantemente, presentándose un incremento de los niveles de DA en NAcc durante la cópula continua (Fiorino et al, 1997) hasta llegar a la saciedad sexual, momento en que los niveles de DA

regresan a niveles basales. A las 24 horas post-saciedad, los niveles de DA en el NAcc están por debajo de los niveles basales de ratas macho sexualmente expertas (Canseco-Alba, en preparación) (Fig. 7).

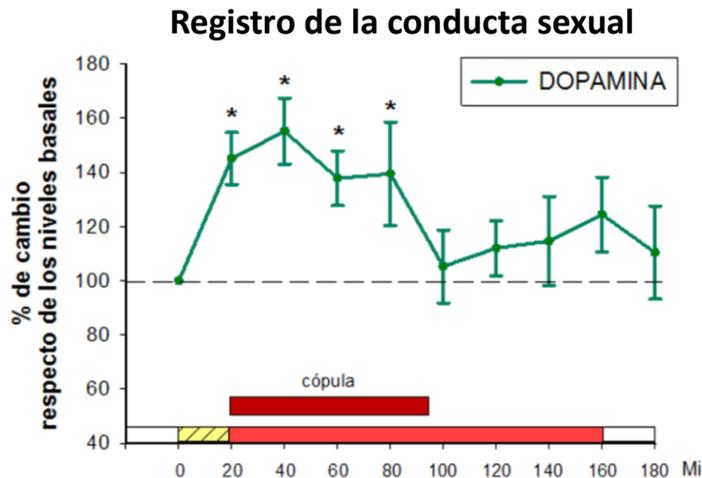


Figura 7. Porcentaje de cambio en los niveles basales de DA de machos sexualmente expertos durante la cópula hasta la saciedad. Se observa un incremento significativo en los niveles de DA en el NAcc con la sola presencia de la hembra sexualmente receptiva (barra amarilla); estos niveles se mantienen elevados durante la cópula (barra roja) y cuando el macho está sexualmente exhausto los niveles de DA tienden a regresar a niveles basales (Canseco-Alba & Rodríguez-Manzo, en preparación)

Por otro lado, también se ha demostrado que la estimulación continua del SMD genera cambios plásticos en el cerebro que se reflejan en cambios conductuales en los machos sexualmente exhaustos. Estos cambios consisten principalmente en la inhibición de larga duración de la conducta sexual y la aparición de una hipersensibilidad generalizada a fármacos (Rodríguez-Manzo, 2011).

Datos del laboratorio demostraron que en los animales sexualmente saciados, la administración sistémica del agonista dopaminérgico inespecífico apomorfina revierte la saciedad sexual, al aumentar el porcentaje de animales que eyacula y reinicia la cópula a las 24 horas post-saciedad. A través de la administración de agonistas específicos para ambas familias de receptores dopaminérgicos (D1-Like y D2-Like), la evidencia sugiere que este efecto está mediado por receptores de la familia D1-Like (Guadarrama-Bazante et al., 2014) (Fig. 8).

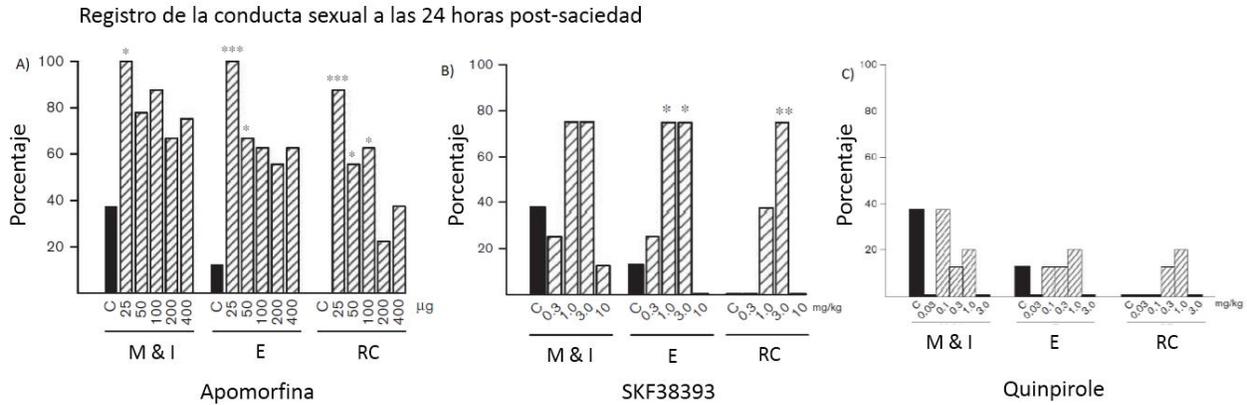


Figura 8. Porcentaje de ratas macho, sexualmente saciadas, que monta e intromite, eyacula y reinicia la cópula a las 24 horas post-saciadad, después de la administración de agonistas dopaminérgicos: A) apomorfina, B) SKF38393 y C) quinpirole. Se observa que el agonista inespecífico apomorfina y de receptores D1-like, SKF38393, revierten la saciedad sexual, mientras que el agonista de receptores D2-like, quinpirole, no tiene efecto (Guadarrama-Bazante et al., 2014).

1.2.3. Glutamato, Conducta Sexual masculina y Sistema Mesolímbico Dopaminérgico.

El glutamato (Glu) es el neurotransmisor excitador por excelencia en el sistema nervioso central (SNC) y es el responsable de la mayoría de los procesos de plasticidad sináptica en el cerebro (Kalivas et al., 2009). En el SNC el Glu se sintetiza por dos vías, la primera a partir del ciclo de Krebs, a través de su precursor el ácido α -cetoglutarato, por la acción de la enzima glutamato deshidrogenasa, y la segunda vía es a partir de glutamina. Ésta es sintetizada por las células gliales y después captada por las neuronas, en donde la enzima glutaminasa la convierte en Glu. Una vez sintetizado, el Glu se almacena en vesículas sinápticas y se libera por exocitosis a través de un proceso dependiente del Ca^{2+} (Rang et al., 2008).

El Glu actúa a través de dos clases de receptores de membrana, receptores ionotrópicos y receptores metabotrópicos. Los receptores glutamatérgicos ionotrópicos son canales iónicos activados por ligando y están formados por cuatro o cinco subunidades protéicas. En el SNC existen 3 tipos de receptores glutamatérgicos ionotrópicos: tipo AMPA (amino-3-hidroxi-4-metil-4-isoxazolepropionato), tipo kainato y tipo NMDA (N-metil-D-aspartato). Por su parte, los receptores metabotrópicos están constituidos por una única cadena peptídica, que está estructurada en 7 segmentos transmembranales, con una región N-terminal extracelular y una región C-terminal

intracelular. Los receptores metabotrópicos están acoplados a proteínas G, lo que les permite ejercer acciones moduladoras en las células. A los receptores metabotrópicos de Glu se les conoce como mGluR y se dividen en 3 grupos: el grupo I (subtipos mGlu1 y mGlu5) acoplado a la proteína Gq, el grupo II (subtipos mGlu2 y mGlu3) acoplado a la proteína Gi y el grupo III (subtipos mGlu4, mGlu6, mGlu7 y mGlu8), también acoplado a la proteína Gi (Rang et al., 2008; Ferrada et al., 2016).

Como se mencionó anteriormente, el glutamato en el SMD está estrechamente involucrado en los procesos motivacionales de las conductas recompensantes, pues las terminales glutamatérgicas del ATV se activan en presencia de recompensas naturales liberando sus neurotransmisores, lo que genera que las neuronas DA del ATV cambien su patrón de descarga hacia una descarga en ráfagas que produce la liberación fásica de dopamina (Balfour et al., 2006; Melis et al., 2012).

Por otro lado, la transmisión glutamatérgica en el ATV se ha asociado con los cambios neuroplásticos que tienen lugar en el SMD como resultado de su activación por drogas de abuso, las cuales “secuestran” al SMD provocando cambios en la actividad de las neuronas del ATV, haciendo que ahora se encuentren en un estado de hiperexcitabilidad (Melis et al., 2012). El desarrollo de comportamientos adictivos relacionados con el consumo de drogas de abuso requiere de la activación de receptores glutamatérgicos en el ATV. Esta activación genera diversos cambios neuroplásticos en las neuronas DA del ATV, que están relacionados con la modificación de las subunidades de los receptores AMPA y NMDA, generando cambios en los fenómenos de potenciación a largo plazo (LTP), lo que provoca a su vez modificaciones en la excitabilidad de las neuronas dopaminérgicas (van Huijstee & Manvelder, 2015; Mameli et al., 2011). En lo que respecta al receptor mGluR5, se ha demostrado que su activación regula directamente la actividad de las neuronas DA, al través de modular positivamente al receptor NMDA y AMPA, induciendo la liberación de DA, además se ha postulado que es un receptor presináptico que también puede modular positivamente las terminales glutamatérgicas para la liberación de sus neurotransmisores en el ATV (Ferrada et al., 2016).

El Glu está involucrado en la regulación de la conducta sexual. Sin embargo, la mayoría de estos estudios se ha centrado en áreas del cerebro que no incluyen al SMD, especialmente en el APOm, una región cerebral importante para los aspectos apetitivos

y consumidores de la conducta sexual masculina. Se ha demostrado que en el APOm los niveles de Glu aumentan durante la cópula, alcanzando un pico máximo durante la eyaculación, que va decayendo durante el IPE (Fig. 9) (Domínguez et al, 2006). Además, la administración de agonistas glutamatérgicos del receptor NMDA? directamente en el APOm, facilita la conducta sexual de ratas macho sexualmente expertas, mientras que los antagonistas de estos receptores glutamatérgicos la afectan negativamente (Will et al., 2014). En lo que respecta al SMD, se ha reportado que las terminales glutamatérgicas de la CPF liberan neurotransmisor en el ATV durante la cópula (Balfour et al., 2006).

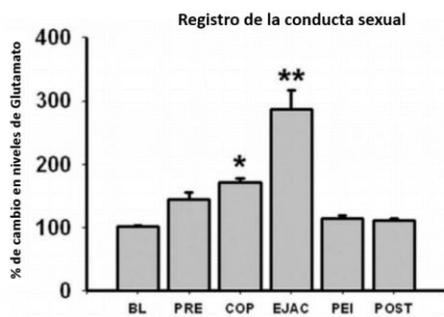


Fig 9. Porcentaje de cambio en los niveles basales (BL) de glutamato en el APOm de ratas macho durante el periodo pre-copulatorio (PRE), el periodo copulatorio (COP), la eyaculación (EJAC), el intervalo post-eyaculatorio (PEI) y periodo post-eyaculatorio (POST) (Domínguez et al., 2006).

En el laboratorio se investigó el papel que juega el glutamato en el fenómeno de saciedad sexual. Los datos obtenidos muestran que el bloqueo de receptores glutamatérgicos tipo NMDA, AMPA y mGluR5, con los antagonistas específicos ketamina, CNQX y MPEP, respectivamente, revierte la saciedad sexual (Fig. 10) (Rodríguez-Manzo, 2015).

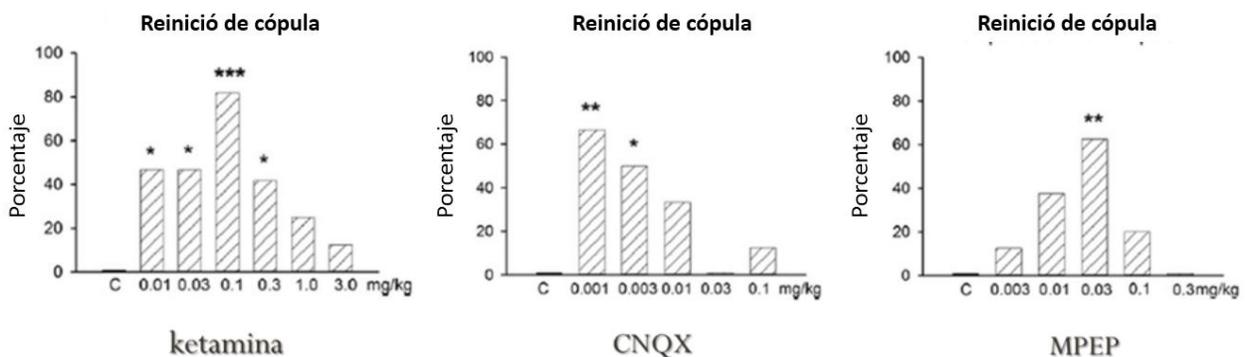


Figura 10. Porcentaje de ratas macho, sexualmente exhaustas, que son capaces de reiniciar la cópula después de haber eyaculado a las 24 horas post-saciedad, en respuesta a la administración de los antagonistas glutamatérgicos ketamina (antagonista de receptores NMDA), CNQX (antagonista de receptores AMPA) y MPEP (antagonista de receptores mGluR5) (Rodríguez-Manzo, 2015).

1.3. Sistema Endocannabinoide (eCN).

Tras el descubrimiento de los componentes psicoactivos de la planta *Cannabis sativa*, los cannabinoides, los investigadores comenzaron a estudiar cómo ejercían sus acciones dentro del organismo. Debido a la naturaleza altamente liposoluble de los cannabinoides, se pensó inicialmente que sus efectos ocurrían a través de mecanismos no específicos asociados a cambios en la fluidez de las membranas. Sin embargo, la alta especificidad de las acciones de los cannabinoides sugirió la posibilidad de mecanismos más específicos, mediados por receptores. Las investigaciones que surgieron dieron paso al descubrimiento del sistema endocannabinoide (Mechoulam, 1986; Ameri, 1999).

1.3.1. Generalidades del Sistema Endocannabinoide.

El sistema endocannabinoide está constituido por los receptores a cannabinoides, los endocannabinoides (eCN) y la maquinaria enzimática para su biosíntesis y degradación (Di Marzo et al., 1998). El papel fisiológico de este sistema aún está siendo investigado, pero se le ha implicado en una amplia variedad de funciones como el control emocional, el desarrollo neuronal, funciones cognitivas, la regulación de la motivación, entre otras (Mechoulam & Parker, 2013).

Receptores a cannabinoides.

A principios de la década de 1980 se descubrió el primer receptor a cannabinoides, el receptor CB1 y en 1993 se descubrió un segundo tipo, el receptor CB2. Ambos receptores, CB1 y CB2, pertenecen a la súper familia de receptores de siete dominios transmembranales, acoplados a proteínas G (GPCR's) (Di Marzo, 1998).

El receptor CB1 está acoplado a una proteína G_i y su activación produce una disminución de los niveles de AMPc, afectando la capacidad de fosforilación de la proteína cinasa A (PKA); del mismo modo, la proteína G_i inhibe los canales de calcio dependientes de voltaje tipo N y P/Q y aumenta la conductancia de los canales de K^+ (Howlett, 1998). También estimula la vía de las MAP cinasas, una serina treonina cinasa que es capaz de traslocarse al núcleo para regular la transcripción de genes. Esta vía está involucrada en la plasticidad sináptica (Fig. 11) (Wilson & Nicoll, 2002).

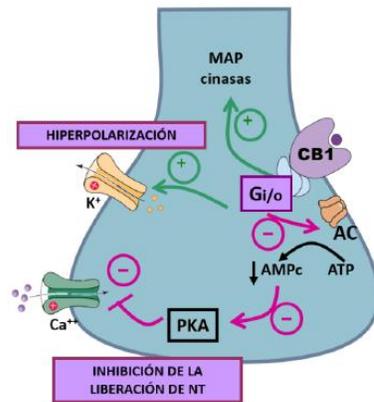


Figura 11. Mecanismos de transducción del receptor CB1 en la neurona pre-sináptica (Ameri, 1999).

El receptor CB1, a pesar de estar presente en numerosos órganos periféricos en cantidades muy bajas (Howllett et al. 2002), es un receptor que se encuentra distribuido principalmente en el SNC, con una mayor densidad en los ganglios basales (sustancia nigra, globo pálido, núcleo entopeduncular y caudado-putamen lateral), ciertas regiones del hipocampo (región CA3) y en el cerebelo. Por otro lado, se encuentra distribuido en cantidades moderadas en las capas I y II de la corteza y en áreas límbicas, como el ATV, el NAcc y la amígdala (Herkenham et al. 1990; Howllett et al. 2002).

El receptor CB2 también está acoplado a una proteína Gi, por lo que su activación disminuye los niveles de AMPc y también activa la vía de las MAPK (Bouaboula et al., 1996), pero a diferencia del receptor CB1, no altera la actividad de canales iónicos (Felder et al, 1995). Originalmente se consideraba que los receptores CB2 estaban presentes sólo en la periferia, en las células del sistema inmune, en donde alcanzan densidades importantes (Roche & Finn. 2010; Parcher y Mechoulam, 2011); sin embargo, ahora también se han identificado en la microglía de algunas regiones del SNC (van Sickle et al. 2005; Ashton et al. 2006; Onaivi et al. 2008).

Los endocannabinoides (eCN)

Por su parte, los eCN son compuestos de naturaleza lipídica, derivados de los fosfolípidos de la membrana, específicamente del ácido araquidónico. A diferencia de los neurotransmisores clásicos, los eCN no se almacenan en vesículas, sino que son sintetizados “a demanda”, por un proceso dependiente de Ca^{+2} (Wilson & Nicoll, 2002). Es decir, que estímulos específicos como la activación repetida de una vía y el aumento en los niveles intracelulares de Ca^{+2} , inician su síntesis y liberación (Alger, 2002).

Los dos eCN mejor caracterizados son la anandamida (N-araquidoniletanolamida, AEA) y el 2- araquidonilglicerol (2-AG) (Fig. 12). Aunque son similares en estructura y función, son muy diferentes en términos de etapas bioquímicas, afinidad a receptores y vías de degradación (Luchicchi & Pistis, 2012).

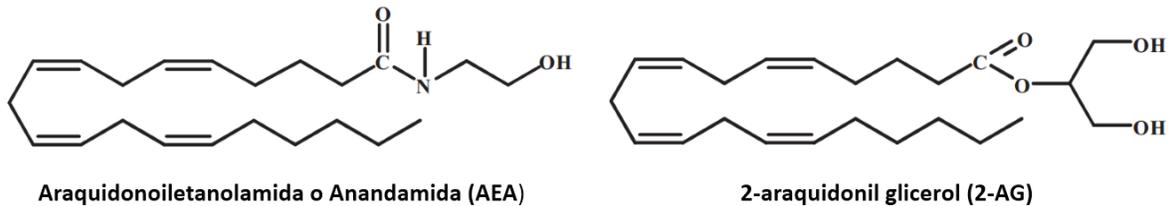


Figura 12. Estructura química de los dos principales endocannabinoides: anandamida y 2-AG (Mechoulam & Parker, 2012).

Anandamida (AEA).

La AEA fue el primer ligando endógeno identificado para el receptor de CB1 (Devane et al. 1992) y actúa sobre él como agonista parcial (Mackie et al., 1993; Mechoulam & Fride, 1995). También se ha identificado efectos de la AEA sobre el receptor CB2, receptores vanilloides (TRPV1) y receptores nucleares (por ejemplo, PPARs) (Luchicchi & Pistis, 2012). La entrada de Ca^{+2} a la célula post-sináptica es la señal que inicia la síntesis de AEA, lo cual puede ocurrir a través de distintas vías.

La primera de ellas resulta de la unión directa de ácido araquidónico y etanolamida. Ambas moléculas pueden obtenerse a partir de la ruptura de fosfolípidos de membrana, por acción de las fosfolipasas A2 y D, respectivamente (Vinod & Hungund, 2005).

Otra ruta de síntesis de AEA involucra a la enzima N-acil-transferasa (NAT), la cual transfiere una molécula de ácido araquidónico (AA) a una molécula de fosfatidiletanolamina para formar N-araquidonilfosfatidiletanolamina (NAPE). A partir de este punto se puede formar AEA por la acción de diferentes enzimas (Fig. 13), por ejemplo: a) se sintetiza AEA a partir de la hidrólisis de la NAPE por acción de una fosfolipasa D específica (NAPE-PLD); b) a partir de una fosfolipasa C (PLC) la NAPE es fosforilada para formar pAEA y ésta a su vez, por acción de la PTPN22 es convertida en AEA; c) a partir de la fosfolipasa A (PLA2) se sintetiza Lyso-NAPE, la cual es convertida en AEA por la acción de una fosfolipasa D específica (LysoPLD); d) ABHD4 hidroliza NAPE a Lyso-NAPE y esta misma enzima ahora produce GP-AEA; por último, e) la acción

de una glicerolfosfodiesterasa (GDE1) produce AEA (Di Marzo et al., 1994; Lui et al., 2006; Luchicchi & Pistis, 2012).

La AEA es removida rápidamente de la hendidura sináptica por un transportador específico, de alta afinidad, denominado FLAT, que es una variante de la enzima FAAH1 (Fu et al., 2012). Tras ser introducida en la neurona post-sináptica, la AEA se hidroliza por acción de la enzima amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH), produciendo ácido araquidónico y etanolamida (Fig. 13) (Mechoulam & Parker, 2013). En menor medida la AEA también puede ser degradada por otras enzimas como NAAA, LOX, COX-2 y el citocromo P450 (Luchicchi & Pistis, 2012).

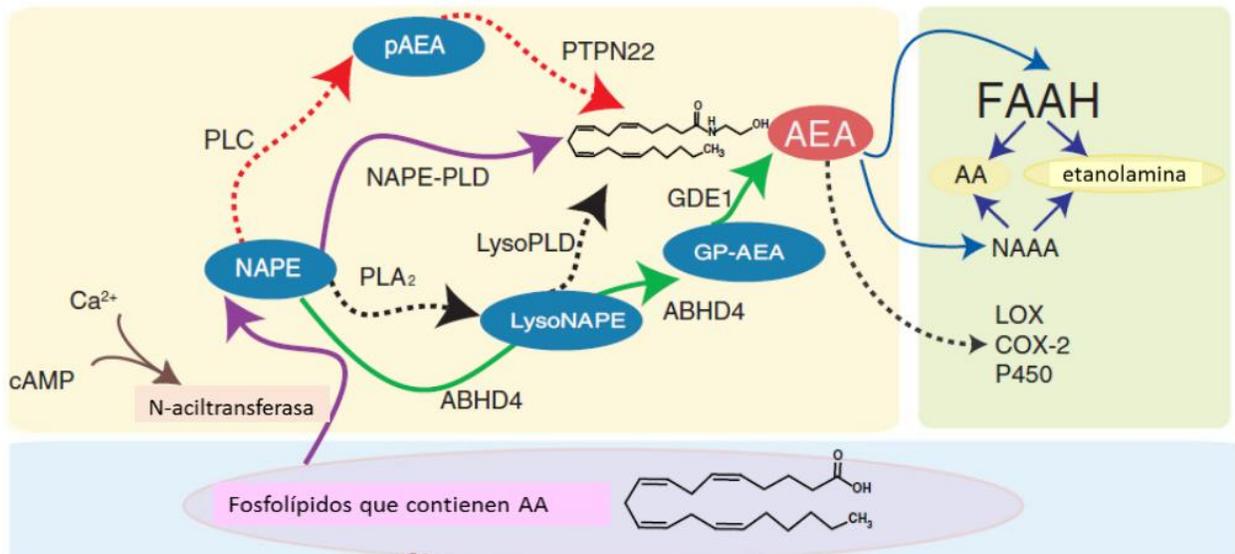


Fig 13. Esquemización de las diferentes vías de síntesis y catabolismo de AEA (Luchicchi & Pistis, 2012).

2-Araquidonilglicerol (2-AG).

En 1995 Mechoulam y col. encontraron un segundo eCN en el intestino de perros (Mechoulam et al, 1995), el 2-AG, y más tarde Kodo y col. lo identificaron en el cerebro de rata (Kodo et al, 1998). El 2-AG es una clase única de monoacilglicerol que actúa como un agonista completo en ambos receptores a cannabinoides (CB1 y CB2) (Sugiura et. al., 2006). El 2-AG se ha asociado a procesos de neuroplasticidad y se ha identificado en el cerebro en mayores cantidades que otros eCN (Luchicchi & Pistis, 2012).

La biosíntesis de 2-AG, al igual que la AEA, inicia por una entrada masiva de Ca^{+2} a la célula post-sináptica, la cual es la señal de síntesis del eCN. El 2-AG se puede sintetizar a través de dos vías. La primera involucra fosfolípidos de membrana como el fosfatidilinositol (PI), que es hidrolizado por la fosfolipasa C (PLC) para formar diacilglicerol, que a su vez es hidrolizado por la diacilglicerol lipasa (DAG-L) en su isoforma α ó β para formar 2-AG (Prescott & Majerus, 1983). La segunda vía involucra la hidrólisis de PI a través de la fosfolipasa A1 (PLA1), que forma lisofosfatidilinositol (Lyso PI), que es hidrolizado por una fosfolipasa C para formar 2-AG (Fig. 14) (Ueda et al., 1993; Tsutsumi et al., 1994; Luchicchi & Pistis, 2012.).

El 2-AG es retirado de la hendidura sináptica, aparentemente por el transportador FLAT (Marsicano & Chaouloff, 2012) y dentro de la célula post-sináptica es degradado principalmente por la monoacilglicerol lipasa (MGL), produciendo ácido araquidónico y glicerol (Gaetani et al., 2009). Sin embargo, el 2-AG también puede ser degradado en menor medida por otras enzimas como la FAAH, la ABHD12 y la ABHD56, los cuales también forman ácido araquidónico y glicerol (Fig. 14) (Luchicchi & Pistis, 2012).

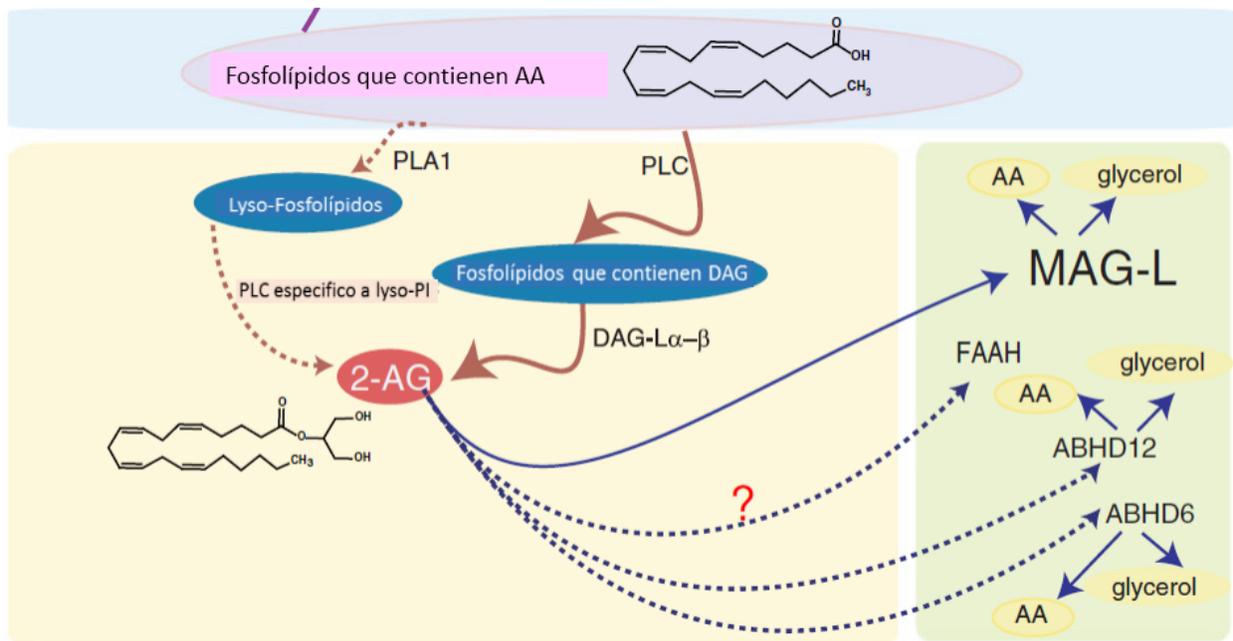


Fig 14. Esquemización de las diferentes vías de síntesis y catabolismo de 2-AG (Luchicchi & Pistis, 2012).

Los eCN son neurotransmisores retrógrados; este término se refiere a la liberación de un mensajero difusible (en este caso el eCN) de una célula post-sináptica (que usualmente recibe una señal) para actuar sobre receptores (CB1 en este caso) localizados en la célula pre-sináptica (Alger, 2002). La principal consecuencia de la señalización retrógrada de los eCN es la inhibición de la liberación de otros neurotransmisores (Fig. 9) (Di Marzo et al., 1998).

Este tipo de señalización le permite al sistema eCN participar en la regulación de múltiples procesos fisiológicos, tanto en el SNC como en los sistemas inmune y cardiovascular. En el SNC participa en diversos procesos como la regulación de la ingesta de alimentos, en la actividad motora, el aprendizaje, la memoria, el control de la temperatura corporal, entre otros (Fride, 2002).

1.3.2. El sistema endocannabinoide y la conducta sexual masculina.

El sistema eCN es importante para la modulación de las respuestas derivadas de recompensas naturales en el SMD (Ameri, 1999; van der Selt & Di-Marzo, 2003), como la ingesta de alimentos, pues se activa transitoriamente ante la exposición a alimentos palatables (Di Marzo & Matías, 2005).

Los primeros estudios relacionados con la conducta sexual de la rata macho establecieron que tanto los cannabinoides como los eCN tenían efectos inhibitorios sobre la cópula (Martínez-González et al., 2004; Murphy et al., 1994; Gorzalka et al., 2008), mientras que el antagonista del receptor CB1, el AM251, la facilitaba (Gorzalka et al., 2008). Sin embargo, datos recientes de nuestro laboratorio demostraron que la AEA tiene más bien efectos bifásicos, dependientes de la dosis, sobre la conducta sexual de machos sexualmente expertos y sexualmente saciados. En ratas sexualmente expertas, la AEA, administrada por vía sistémica, a dosis altas (3 mg/kg o mayores) inhibe la conducta sexual como se había reportado, pero dosis menores (0.03-1 mg/kg) la facilitan (Canseco-Alba & Rodríguez-Manzo, 2014). En ratas sexualmente saciadas, a las que se les administro AEA sistémicamente, se demostró que dosis bajas (0.1 - 0.3 mg/kg) revierten la saciedad sexual (Fig.15) (Canseco-Alba & Rodríguez-Manzo, 2014).

Registro de la conducta sexual a las 24 horas post-saciedad

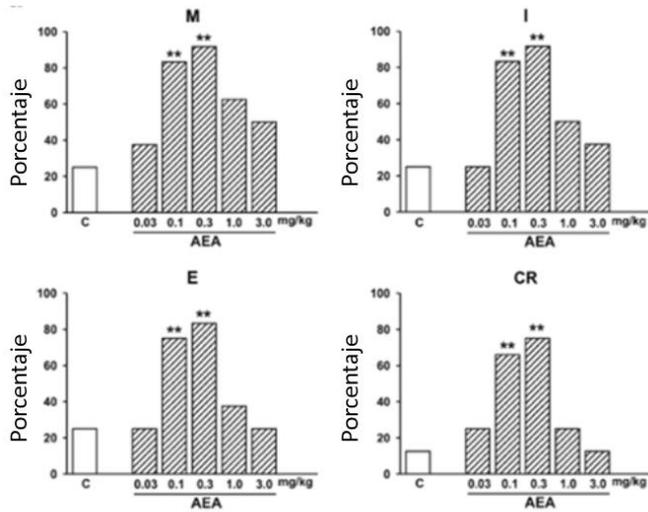


Figura 15. Porcentaje de animales sexualmente exhaustos que monta, intromite, eyacula y reinicia la cópula a las 24 horas post-saciedad en respuesta a la administración del eCN AEA (Canseco-Alba y Rodríguez-Manzo, 2014).

Para demostrar que este efecto facilitador de la AEA ocurría en el ATV, estudios posteriores en el laboratorio demostraron que la administración directa de AEA sobre el ATV también tiene efectos bifásicos similares en comparación cuando a se administra sistémicamente, por lo tanto dosis bajas de AEA administradas intra-ATV revierten la saciedad sexual de machos exhaustos (Canseco-Alba & Rodríguez-Manzo, 2016).

Registro de la conducta sexual a las 24 horas post-saciedad

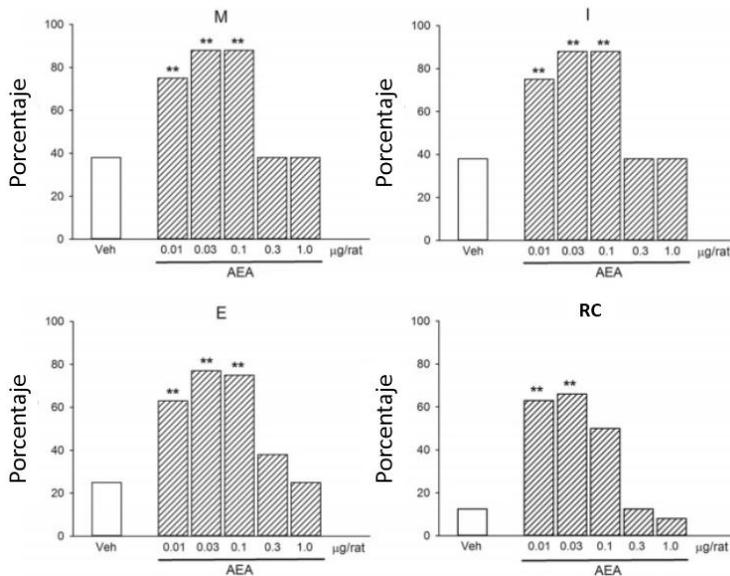


Figura 16. Porcentaje de animales sexualmente exhaustos que monta, intromite, eyacula y reinicia la cópula a las 24 horas post-saciedad en respuesta a la administración intra- ATV del eCN AEA (Canseco-Alba y Rodríguez-Manzo, 2016).

Por otro lado, se demostró que el bloqueo de receptores CB1 durante la cópula hasta la saciedad interfiere con el establecimiento de la inhibición sexual a las 24 horas post-saciedad, con lo que se demostró que los eCN participan en el establecimiento de este fenómeno inhibitorio (Fig. 17) (Canseco-Alba & Rodríguez-Manzo, 2014).

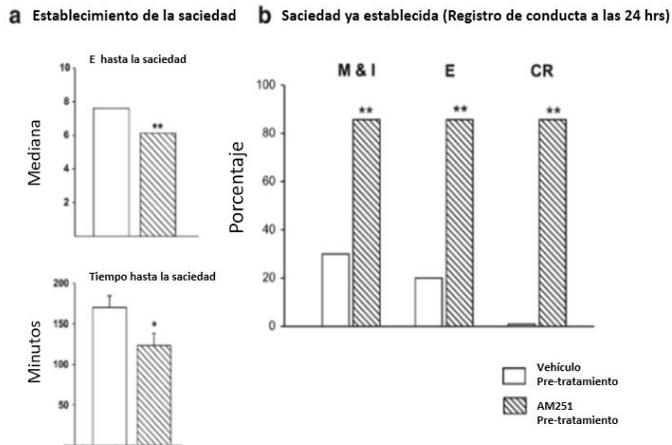


Figura 17. Papel de los eCN en el establecimiento de la saciedad sexual. A ratas sexualmente expertas se les administró el antagonista a receptores CB1 AM251 antes de la cópula hasta la saciedad, lo que redujo el tiempo y el número de eyaculaciones requeridas para alcanzar la saciedad (a) y a las 24 horas post saciedad se observó que los animales no estaban sexualmente inhibidos (b) (Canseco-Alba & Rodríguez-Manzo, 2014).

En nuestro laboratorio también se ha investigado el papel del 2-AG en la saciedad sexual. Datos recientes muestran que este eCN se comporta de manera similar a la AEA en ratas saciadas, pues tiene efectos bifásicos, dependientes de la dosis, revirtiendo la saciedad a dosis bajas (0.1 – 1mg/kg), efecto que se pierde a dosis mayores. (Fig. 18) (Datos del laboratorio aún no publicados).

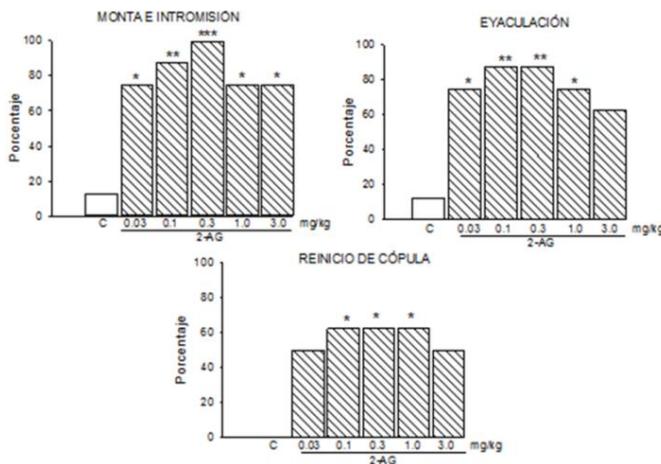


Figura 18. Porcentaje de animales sexualmente exhaustos que monta, intromite, eyacula y reinicia la cópula a las 24 horas post-saciedad en respuesta a la administración del eCN 2-AG (Datos del laboratorio aún no publicados).

1.4. El Sistema Endocannabinoide y el Sistema Mesolímbico Dopaminérgico.

Los receptores CB1 están ampliamente distribuidos en el SNC. Estudios neuroanatómicos han mostrado que en el circuito de la recompensa hay receptores CB1 y eCN, concretamente en el ATV, el NAcc y la amígdala (Herkeman et al, 1990). En el ATV los receptores CB1 se expresan en las terminales axónicas de neuronas GABAérgicas extrínsecas y de interneuronas GABAérgicas, así como en las terminales de neuronas glutamatérgicas tanto intrínsecas como extrínsecas, que hacen sinapsis con las neuronas dopaminérgicas (Fitzgerald et al., 2012; Freund, 2003). Los eCN son sintetizados y liberados de los somas de las neuronas dopaminérgicas del ATV y actúan de forma retrógrada en las terminales glutamatérgicas y GABAérgicas, inhibiendo la liberación de sus neurotransmisores y con ello, modulando la liberación de DA en el NAcc (Riegel & Lupica, 2004). Con ello se ha propuesto que los eCN que actúan en el SMD juegan un papel importante en la modulación de los procesos motivacionales y recompensantes de los individuos (Gardner, 2005).

En el NAcc los receptores CB1 se encuentran expresados en las terminales de interneuronas GABAérgicas y de neuronas glutamatérgicas extrínsecas que hacen sinapsis con las neuronas espinosas medias (MSN), que son de naturaleza GABAérgica. Las propias MSN contienen receptores CB1 en sus terminales sinápticas, algunas de las cuales proyectan de regreso hacia el ATV. Por último, encontramos receptores CB1 en las terminales dopaminérgicas que hacen sinapsis con las MSN del NAcc (Gardner, 2005). En el NAcc son las MSN las que sintetizan y liberan los eCN que regulan la vía GABAérgica que proyecta del NAcc al ATV y las vías de salida del NAcc hacia otras regiones cerebrales (Lupica et al., 2004).

Por otro lado, se ha establecido que la AEA interactúa con el sistema dopaminérgico para revertir la saciedad sexual, pues dicha reversión puede ser bloqueada por el antagonista inespecífico de receptores dopaminérgicos haloperidol, mientras que dosis sub-efectivas de AEA y del agonista inespecífico de receptores dopaminérgicos apomorfina sinergizan sus efectos para revertir la saciedad sexual (Fig. 19) (Canseco-Alba et al, en preparación)

Registro de la conducta sexual a las 24 horas post-saciedad

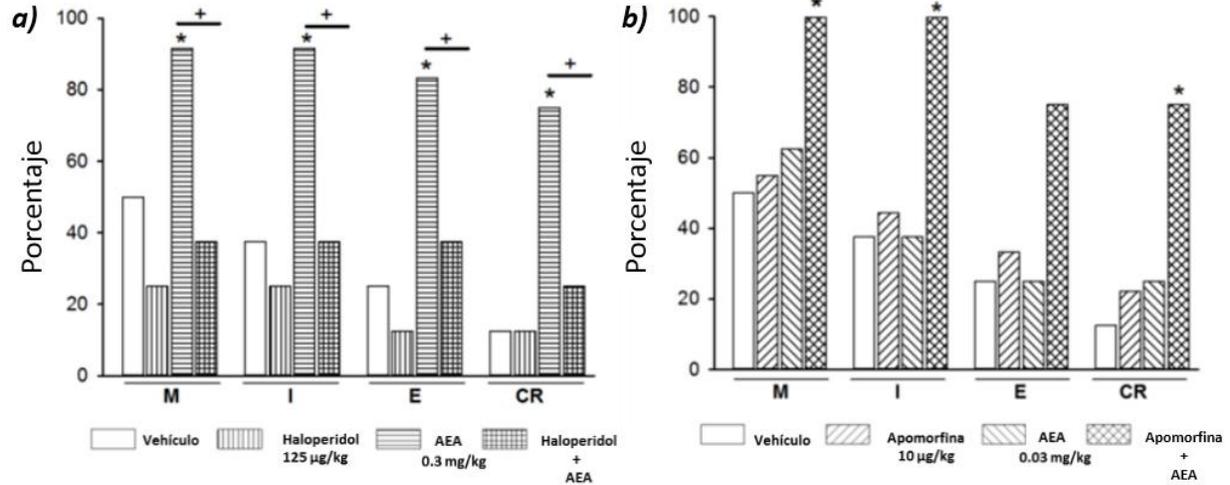


Figura 19. Interacción de la AEA con el sistema dopaminérgico a través de 2 protocolos:

- El bloqueo de la reversión de la saciedad producida por AEA con el antagonista DA inespecífico haloperidol
- El sinergismo de dosis subefectivas de AEA y el agonista inespecífico DA apomorfina para revertir la saciedad sexual (Canseco-Alba et al, en preparación).

2. Planteamiento del problema

La conducta sexual es una conducta recompensante y en su modulación participa el SMD. Durante la cópula hasta la saciedad, el SMD es activado constantemente, induciendo cambios plásticos que se expresan como una inhibición sexual de larga duración, una hipersensibilidad generalizada a fármacos, así como alteraciones en otras respuestas fisiológicas. El sistema eCN regula la actividad del SMD a través de modular la liberación de GABA y glutamato en el ATV y el NAcc.

Se ha demostrado que dosis bajas de los eCN AEA y 2-AG revierten la inhibición sexual característica de ratas sexualmente exhaustas y que la AEA interactúa con la DA para producir este efecto, sin embargo no se sabe si el 2-AG también interactúa con el sistema DA para revertir la saciedad sexual. Por otro lado, la administración intra-ATV de AEA también revierte la saciedad sexual (Canseco-Alba & Rodríguez-Manzo, 2016). Si bien se sabe que las terminales glutamatérgicas del ATV contienen receptores CB1, aún no se conoce si los eCN interactúan con la transmisión glutamatérgica en esta área cerebral para revertir la saciedad sexual.

3. Hipótesis

1. El 2-AG interactuará con la transmisión dopaminérgica para revertir la saciedad sexual.

2. La transmisión glutamatérgica participará en la reversión de la saciedad sexual producida por los eCNs 2-AG y AEA.

3. La activación de receptores glutamatérgicos mGluR5 del ATV en machos sexualmente exhaustos, bloqueará la reversión de la saciedad sexual inducida por el endocannabinoide 2-AG.

4. Objetivos

Objetivos generales

1. Determinar si el 2-AG interactúa con la dopamina para revertir la saciedad sexual.
2. Establecer si el sistema glutamatérgico participa en los efectos del 2-AG y la AEA para revertir la saciedad sexual y si esa interacción ocurre en el ATV.

Objetivos específicos

1. Determinar si la administración de dosis sub-efectivas de 2-AG y apomorfina sinergizan para revertir la saciedad sexual.
2. Determinar si la reversión de la saciedad producida por 2-AG es bloqueada por el antagonista dopaminérgico inespecífico haloperidol.
3. Establecer si dosis sub-efectivas de 2-AG ó AEA actúan en conjunto con dosis sub-efectivas de ketamina, un antagonista de receptores NMDA, para revertir la saciedad sexual.
4. Establecer si dosis sub-efectivas de 2-AG ó AEA interactúan con dosis sub-efectivas del antagonista de receptores mGluR5 MPEP para revertir la saciedad sexual de ratas macho.
5. Establecer si la administración sistémica de dosis sub-efectivas de 2-AG ó AEA interactúan con dosis sub-efectivas del antagonista de receptores AMPA CNQX para revertir la saciedad sexual

6. Estudiar si la reversión de la saciedad sexual producida por 2-AG puede bloquearse con la administración intra-ATV del agonista de los receptores glutamatérgicos mGluR5, el CHPG.

5. Materiales y métodos

5.1. Animales.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, con un peso de 250 - 300 g, como sujetos de experimentación. Las ratas fueron alojadas en grupos de 8, en cajas de acrílico y en una habitación con temperatura (23-25°C) y humedad (50-60%) controladas, con un ciclo luz/oscuridad invertido (12 h/12 h, la luz se enciende a las 10 AM). Los animales tuvieron libre acceso a agua y alimento.

Se usaron ratas hembras sexualmente receptivas, las cuales sirvieron como estímulo para las pruebas conductuales. La receptividad sexual se les indujo por la administración secuencial, por vía subcutánea, de benzoato de estradiol (14 µg/rata) seguida 19 horas más tarde de la administración de progesterona (6 mg/rata). Las hembras estuvieron sexualmente receptivas 4 horas después de la administración de progesterona.

5.2. Registro de la conducta sexual.

Las pruebas de conducta sexual se realizaron durante la fase oscura del ciclo, en un cuarto iluminado con luz roja. Las ratas macho se introdujeron en un cilindro de acrílico, y se les permitió un periodo de adaptación de 5 minutos antes de introducir a la hembra receptiva y registrar la conducta sexual.

Los machos fueron sometidos a 5 pruebas independientes de conducta sexual antes de los experimentos y se seleccionaron aquéllos que presentaron latencias de eyaculación menores a 15 minutos en al menos 3 de las pruebas, que es el criterio utilizado para considerarlos sexualmente expertos.

En las pruebas de conducta sexual se determinó el porcentaje de ratas sexualmente exhaustas que presentó las conductas de monta (M), de intromisión (I), de eyaculación (E), y que reinició la cópula después de la eyaculación (RC). En aquellos animales que eyacularon se determinaron los siguientes parámetros específicos de la cópula: latencia

de intromisión (LI), latencia de eyaculación (LE), número de montas (M) y número de intromisiones (I) que preceden a la eyaculación, duración del intervalo post-eyaculatorio (IPE) y el número de eyaculaciones presentadas en el tiempo de observación.

5.3. Paradigma de Saciedad sexual.

A ratas macho sexualmente expertas se les permitió copular *ad libitum* con una misma hembra receptiva durante 4 horas, periodo que es suficiente para que todos los sujetos alcancen el criterio de saciedad sexual. Este criterio establece que un animal está sexualmente saciado cuando transcurren 90 minutos desde su última eyaculación sin que vuelva a eyacular (Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1994). Los tratamientos farmacológicos se administraron a las 24 horas post-saciedad y posteriormente se registró la conducta sexual. El registro se dio por terminado cuando los animales realizaron 2 series copulatorias o transcurrieron 30 minutos a) sin que el animal presentara conducta sexual, b) desde la intromisión sin que el macho eyaculara ó c) después de una eyaculación sin que reiniciara la cópula.

5.4. Prueba de conducta ambulatoria espontánea.

Se registró la conducta ambulatoria espontánea de ratas macho después de las pruebas de conducta sexual, con el objeto de descartar la presencia de alteraciones motrices provocadas por los distintos tratamientos farmacológicos que pudieran haber interferido con la ejecución de la conducta sexual. En esta prueba, los animales se colocaron individualmente en una caja de acrílico, cuya base está dividida en 12 cuadrantes. Se contabilizó el número de veces que los animales pasaron de un cuadrante a otro durante 5 minutos, entre cada prueba la caja se limpió con una solución para eliminar los rastros de olor de la prueba anterior.

5.5. Fármacos

La siguiente tabla detalla los fármacos que se utilizaron para este trabajo, los vehículos en los que se disolvieron y la vía de administración.

Fármaco	Vehículo	Vía de administración
Benzoato de estradiol	Aceite de maíz	subcutánea
Progesterona	Aceite de maíz	subcutánea
2-Araquidonoilglicerol (2-AG)	Mezcla de agua destilada, alcohol y Tween 80	intra-peritoneal
Anandamida (AEA)	Mezcla de agua destilada, alcohol y Tween 80	intra-peritoneal
Apomorfina	Agua destilada	intra-peritoneal
Haloperidol	Ácido ascórbico al 1% y agua destilada	intra-peritoneal
Ketamina	Agua destilada	intra-peritoneal
MPEP	Solución salina	intra-peritoneal
CNQX	Solución salina	intra-peritoneal
CHPG	Solución salina	intra-ATV

5.6. Cirugía estereotáxica y administración intra-ATV

Para la administración intracerebral de tratamientos se implantó bilateralmente a ratas sexualmente expertas con cánulas guía, dirigidas al ATV. Para ello, las ratas se anestesiaron con una mezcla de ketamina (90 mg/kg, i.p.) y xilazina (10 mg/kg, i.p.). El animal anestesiado se montó en un aparato estereotáxico (Marca Stoelting), se realizó una incisión en la piel de la cabeza para exponer el cráneo y, con ayuda de una atlas del cerebro de la rata (Paxinos & Watson, 2009), se identificaron las coordenadas correspondientes a la ubicación del ATV (AP: -5.2 mm desde bregma, L: \pm 1.0 mm). Posteriormente se realizaron dos trépanos, de manera bilateral, para implantar las cánulas guía (1 cm de longitud). Después de la cirugía los animales tuvieron un periodo de recuperación de una semana.

Las ratas macho sexualmente expertas ya implantadas se sometieron a una sesión de cópula hasta la saciedad y 24 horas después se les administró el tratamiento intra-ATV, por medio de cánulas de inyección, conectadas a través de un catéter a jeringas Hamilton. Con la ayuda de una bomba de infusión (Marca Braintree Scientific Inc.) se infundieron los fármacos en un volumen de 0.5 μ l/cánula/3min. Al finalizar la administración se dejó la cánula de inyección un minuto más para permitir la difusión total del fármaco. Inmediatamente después se registró la conducta sexual.

5.7. Verificación del sitio de implantación

Después de finalizados los registros de conducta sexual y actividad ambulatoria se anestesió profundamente a los animales con pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.), se realizó una perfusión intracardiaca con 250 ml de una solución de cloruro de sodio (NaCl) al 0.9%, seguido de 250 ml de formaldehído al 10%. A continuación se extrajeron los cerebros de los animales, se colocaron en una solución de formaldehído y se almacenaron a temperatura ambiente para su uso posterior.

Cada cerebro se montó en un crióstato para realizar cortes coronales de 60 μ m de grosor y así localizar las rebanadas que contenían al ATV, mismas que se montaron en un portaobjetos y, con ayuda de un escáner, se obtuvieron imágenes de los cortes en donde se verificó la ubicación correcta de las cánulas en el sitio de interés, en este caso en el ATV.

5.8. Diseño Experimental.

Se utilizaron grupos independientes de ratas macho sexualmente expertas que fueron sometidas al paradigma de saciedad y a las 24 horas post-saciedad se evaluó el efecto de los distintos tratamientos farmacológicos sobre la conducta sexual. A continuación se detallará el diseño experimental utilizado para el cumplimiento de los distintos objetivos específicos.

Objetivos específicos 1 y 2. Determinar si la administración de dosis sub-efectivas de 2-AG y apomorfina sinergizan para revertir la saciedad sexual y si la reversión de la saciedad producida por 2-AG es bloqueada por el antagonista dopaminérgico inespecífico haloperidol.

Se utilizaron grupos independientes de ratas macho sexualmente saciadas (n=8-12), a las cuales se les administraron, a las 24 horas post-saciedad: a) una dosis sub-efectiva del eCN 2-AG (0.03 mg/kg) junto con una dosis sub-efectiva de apomorfina (10 μ g/kg), b) la combinación de vehículos o c) una dosis de 2-AG que revierte la saciedad sexual (0.3 mg/kg) junto con una dosis de haloperidol que no tiene efecto sobre la cópula (125 μ g/kg) y d) la combinación de vehículos (ver diagramas 1 y 2).

Diagrama 1

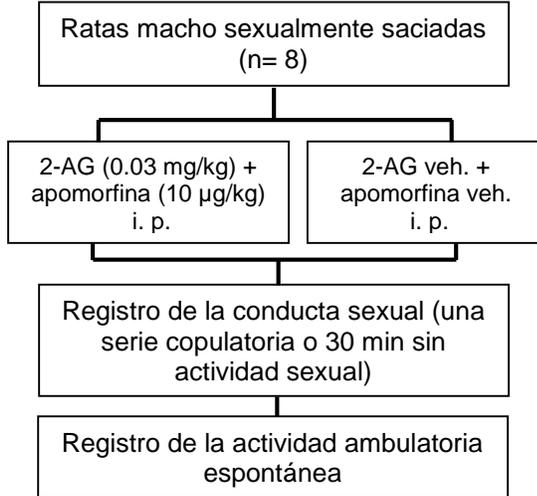
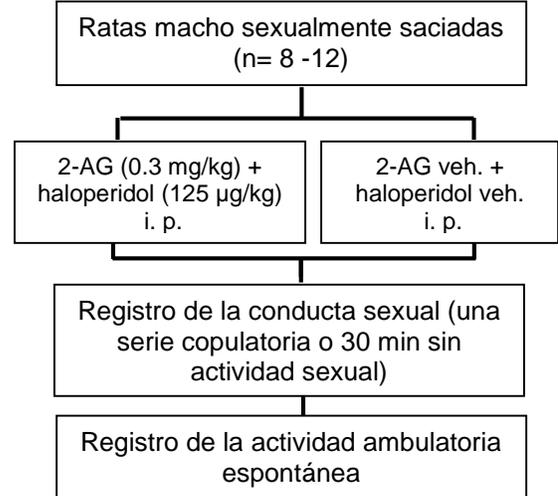


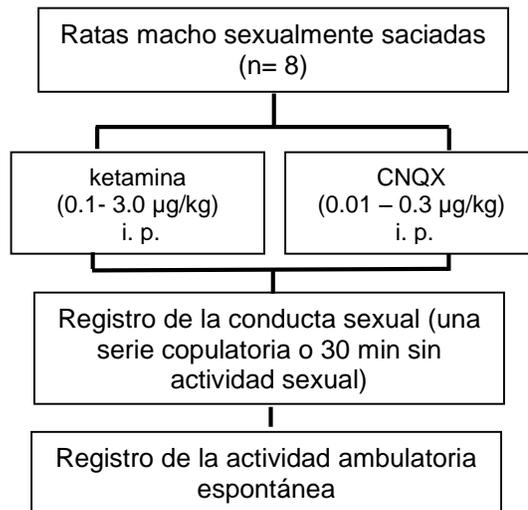
Diagrama 2



Objetivos específicos 3 - 5. Establecer si dosis sub-efectivas de 2-AG ó AEA actúan en conjunto con dosis sub-efectivas de ketamina, un antagonista de receptores NMDA del antagonista de receptores mGluR5, MPEP, o del antagonista de receptores AMPA CNQX para revertir la saciedad sexual.

Previo a la realización de estos experimentos y tomando como base el artículo de Rodríguez-Manzo (2015), se realizaron curvas dosis respuesta de los antagonistas glutamatérgicos ketamina y CNQX (Ver figura 10) para identificar aquellas dosis que por sí solas no revirtieran la saciedad sexual (dosis sub-efectivas), pues en ese trabajo aún no se identificaban tales dosis. Para ello se ocuparon machos sexualmente saciados y a las 24 horas post-saciedad se les administraron diferentes dosis de cada fármaco y posteriormente se evaluó su conducta sexual (ver diagrama 3).

Diagrama 3



Se utilizaron grupos independientes de ratas macho sexualmente saciadas (n= 8), a los cuales se les co-administró, a las 24 horas post-saciadad, una dosis sub-efectiva de los eCN 2-AG (0.03 mg/kg) o de AEA (0.03 mg/kg), junto con una dosis sub-efectiva del antagonista glutamatérgico NMDA ketamina (0.1 µg/kg) o del antagonista glutamatérgico mGluR5 MPEP (0.01 mg/kg) (ver diagramas 4 y 5).

Diagrama 4

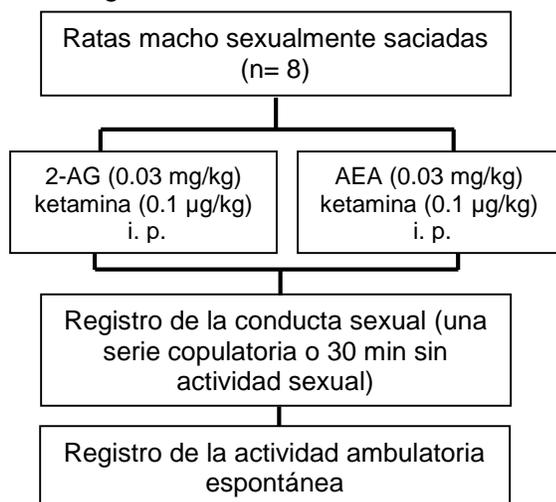
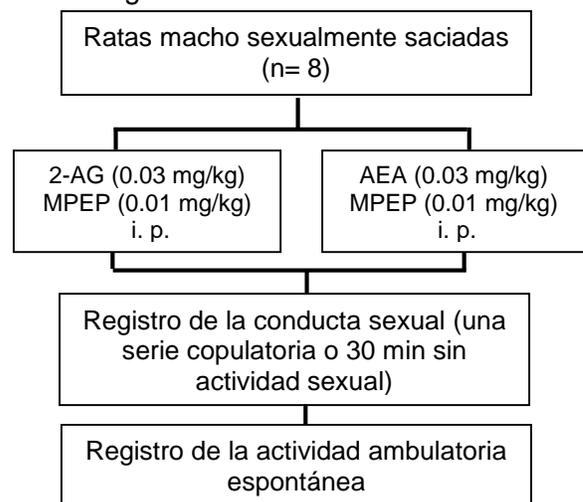
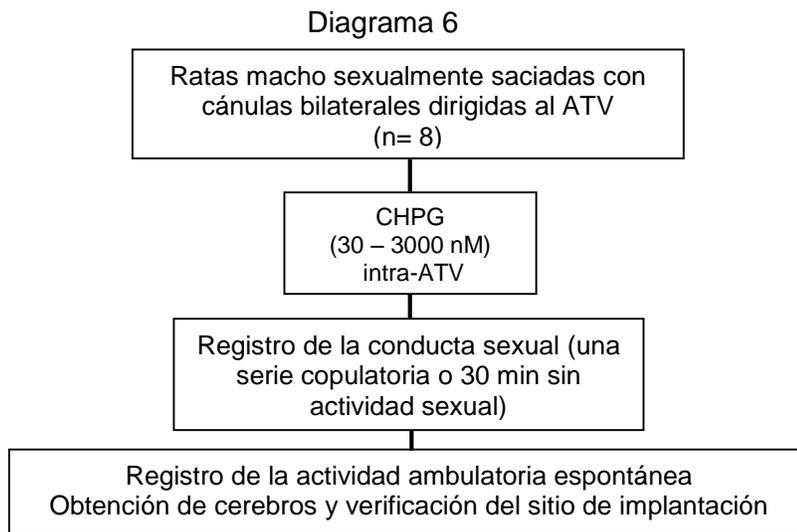


Diagrama 5



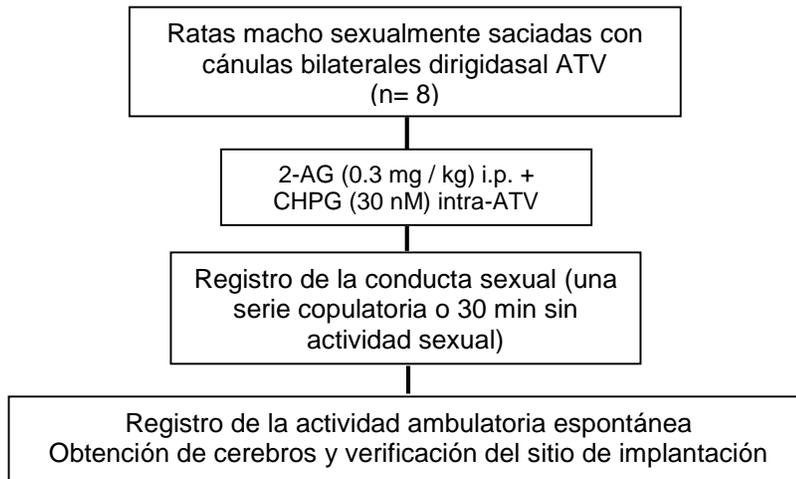
Objetivo específico 6. Establecer si la reversión de la saciedad sexual producida por 2-AG puede bloquearse con la administración intra-ATV del agonista de los receptores glutamatérgicos mGluR5, el CHPG

Primeramente se realizó una curva dosis-respuesta de los efectos del agonista glutamatérgico CHPG administrado por vía intra-ATV para identificar una dosis que no tuviera efecto sobre la cópula de animales sexualmente saciados. Para ello se ocuparon grupos independientes de machos sexualmente expertos, implantados con cánulas bilaterales en el ATV que se sometieron al paradigma de saciedad sexual. A las 24 horas post-saciedad se les administraron diferentes concentraciones de CHPG (30-3000 nM) e inmediatamente después se evaluó su conducta sexual (ver diagrama 6).



Además, a un grupo de ratas macho sexualmente saciadas, implantadas bilateralmente con cánulas dirigidas al ATV (n= 8) se le administró a las 24 horas post-saciedad por vía intra-peritoneal una dosis efectiva de 2-AG (0.3 mg/kg) inmediatamente antes de la infusión intra-ATV de una concentración de 30 nM de CHPG (ver diagrama 7).

Diagrama 7



5.9. Análisis estadístico.

Se utilizó la prueba estadística F de Fisher para analizar las diferencias en los porcentajes de animales que presentaron las diferentes respuestas sexuales. Las comparaciones de los parámetros específicos de la cópula se realizaron por medio de un ANOVA de Kruskal-Wallis seguido de Dunn's o por medio de la U de Mann-Whitney cuando las comparaciones eran pareadas. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con una $p < 0.05$.

6. Resultados.

6.1. Interacción de 2-AG con el sistema dopaminérgico.

En la figura 20 se muestra el efecto de la co-administración de apomorfina (10 µg/kg) y de 2-AG (0.03 mg/kg) sobre los porcentajes de ratas sexualmente exhaustas que muestran las conductas de monta, de intromisión, de eyaculación y que reinicia la cópula después de la eyaculación a las 24 horas post-saciedad. Como se puede observar, cada uno de los fármacos administrados por separado, no modificaron significativamente el porcentaje de ratas sexualmente exhaustas que presentó cada una de las respuestas al compararlos con el grupo control. Sin embargo, la administración conjunta de estos tratamientos aumentó significativamente el porcentaje de ratas sexualmente exhaustas que intromitió ($p < 0.05$), eyaculó ($p < 0.001$) y reinició la cópula ($p < 0.001$) a las 24 horas post-saciedad al compararlos con el grupo control. Este aumento también fue significativo en comparación con el grupo tratado sólo con 2-AG en la proporción de machos saciados que montó e intromitió ($p < 0.05$), eyaculó ($p < 0.01$) y reinició la cópula ($p < 0.001$). Finalmente la comparación con el grupo tratado sólo con apomorfina, mostró que el aumento fue significativo en el porcentaje de animales que eyaculó ($p < 0.05$) y reinició la cópula ($p < 0.01$). El aumento significativo en la proporción de animales saciados que reinicia la cópula después de la eyaculación se interpreta como indicativo de la reversión de la saciedad sexual.

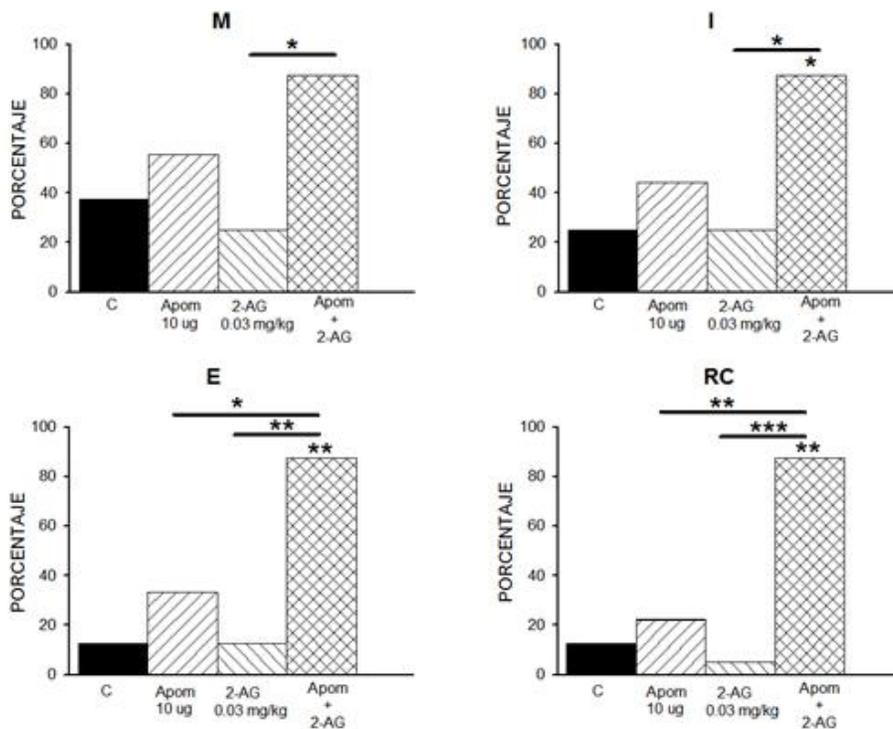


Figura 20. Porcentaje de ratas macho sexualmente saciadas que presenta las conductas de monta (M), intromisión (I), de eyacuación (E) y que reinició de cópula después de la eyacuación (RC) a las 24 horas post-saciedad en respuesta al tratamiento con vehículo (n=8), 10 µg/kg de apomorfina (Apom; n=9), 0.03 mg/kg 2-AG (n=8) o la combinación de apomorfina y 2-AG (n=8). F de Fisher *p < 0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

En la figura 21 se muestra el efecto de la administración de 2-AG a una dosis efectiva (0.3 mg/kg), de haloperidol (125 µg/kg) y de la combinación de ambos tratamientos sobre la conducta sexual de machos sexualmente exhaustos. Como se puede observar el 2-AG aumentó significativamente el porcentaje de ratas sexualmente exhaustas que montó e intromitió, eyaculó y que reinició la cópula después de la eyacuación (p<0.01) a las 24 horas post-saciedad. El haloperidol careció de efecto por sí mismo, pero canceló el efecto facilitador del 2-AG cuando se co-administraron ambos tratamientos.

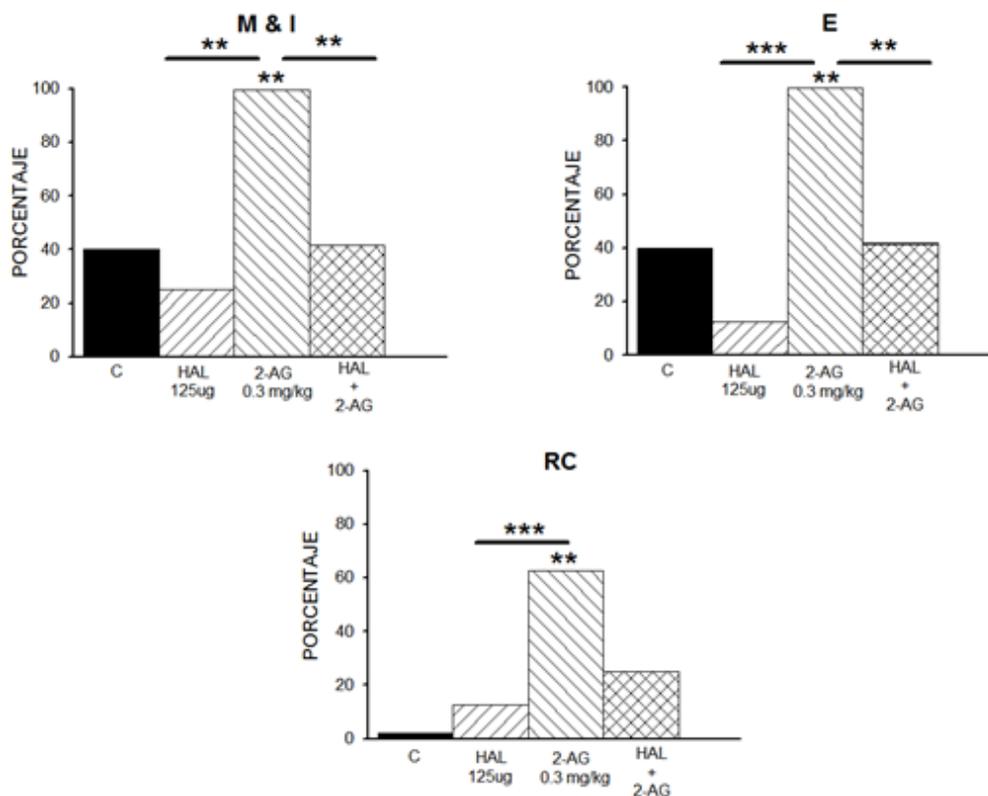


Figura 21. Porcentaje de ratas sexualmente saciadas que presenta las conductas de monta (M), intromisión (I), de eyaculación (E) y que reinicia la cópula después de la eyaculación (RC) a las 24 horas post-saciedad en respuesta al tratamiento con vehículo (n=10), 125 µg/kg de haloperidol (HAL, n=8), 0.3 mg/kg de 2-AG (n=8) o la combinación de haloperidol y 2-AG (n=12). F de Fisher **p< 0.01; ***p<0.001

6.2. Interacción de los eCN AEA y 2-AG con el sistema glutamatérgico

Se realizó una curva dosis-respuesta de los efectos de ketamina (0.1 a 3.0 µg/kg) sobre la conducta sexual de ratas sexualmente exhaustas para identificar una dosis subefectiva de este fármaco. Esta curva es una continuación de la publicada en el trabajo de Rodríguez-Manzo (2015), pero probando dosis menores (ver figura 10). En la figura 22 se puede observar que la dosis de 0.1 µg/kg de ketamina careció de efectos significativos sobre la cópula de ratas saciadas, mientras que las dosis mayores probadas aumentaron significativamente el porcentaje de animales sexualmente saciados que eyaculó y reinició la cópula después de la eyaculación.

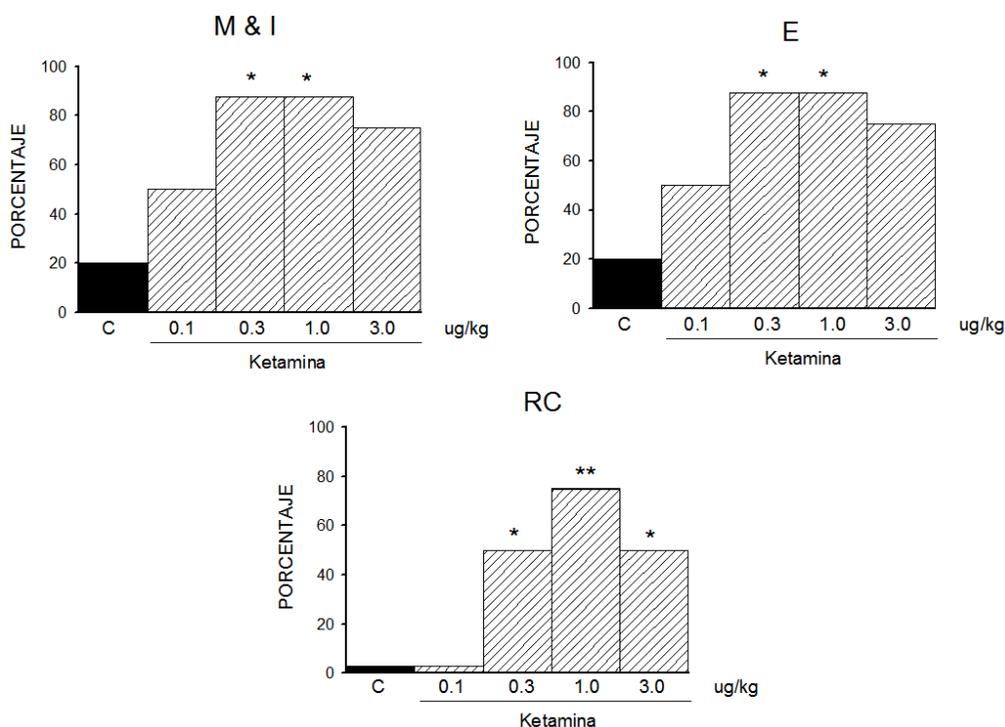


Figura 22. Efecto de diferentes dosis de ketamina (0.1-3 $\mu\text{g}/\text{kg}$; $n=8$), sobre el porcentaje de ratas sexualmente saciadas que presenta las conductas de monta e intromisión (M & I), de eyaculación (E) y que reinicia la cópula después de la eyaculación (RC) a las 24 horas post-saciación. F de Fisher: * $p<0.05$; ** $p<0.01$

El efecto de la co-administración de dosis sub-efectivas del antagonista de receptores NMDA ketamina (0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y del endocannabinoide 2-AG (0.03 mg/kg) sobre el porcentaje de ratas sexualmente exhaustas que muestran las conductas de monta, intromisión, de eyaculación y que reinicia la cópula después de la eyaculación a las 24 horas post-saciación, se muestra en la figura 23. Se puede observar que por sí solos cada uno de los fármacos no modificó significativamente estos porcentajes. Por otro lado, la co-administración de ambos fármacos produjo una tendencia al aumento en los porcentajes de animales saciados que montaron, intromitieron y eyacularon, pero que no fue significativo. Sin embargo, todos los animales que eyacularon reiniciaron la cópula después de la eyaculación y el aumento en este porcentaje fue estadísticamente significativo al compararlo tanto con el grupo control como con los grupos que recibieron cada uno de los tratamientos por separado ($p<0.05$), lo que indica una reversión de la saciedad sexual.

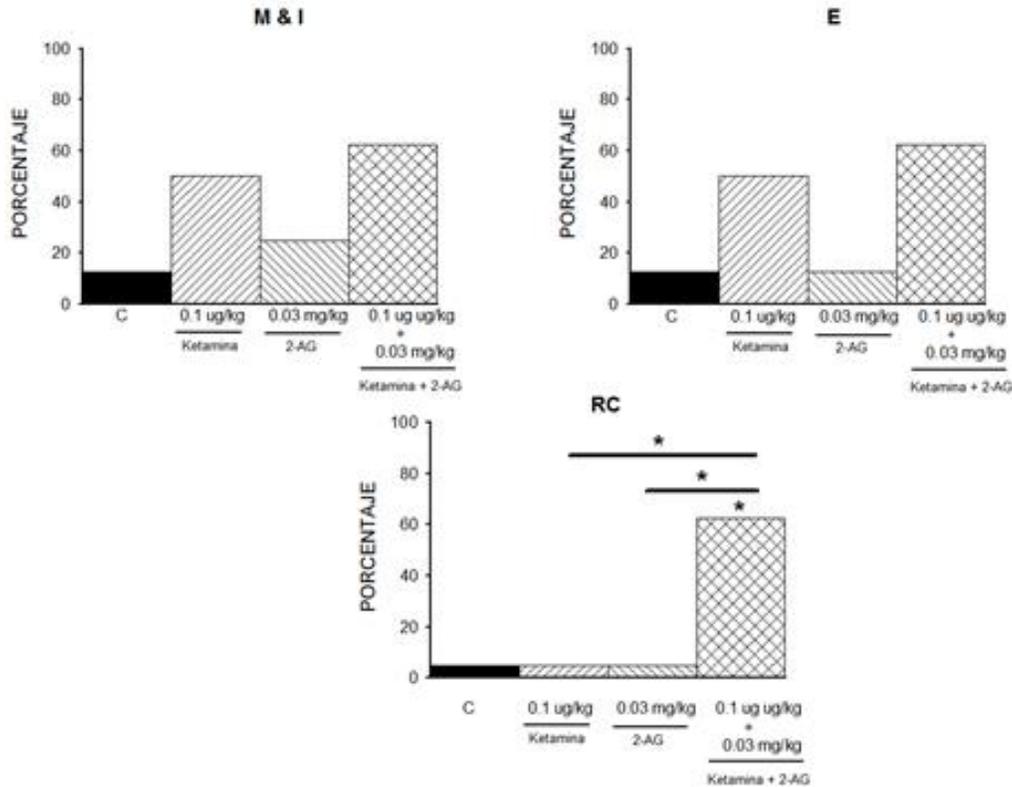


Figura 23. Porcentaje de ratas macho sexualmente saciadas que presenta las conductas de monta e intromisión (M & I), de eyaculación (E) y que reinicia la cópula después de la eyaculación (RC) a las 24 horas post-saciedad en respuesta al tratamiento con vehículo (n=8), 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de ketamina (n=8), 0.03 mg/kg de 2-AG (n=8) o la combinación de ketamina y 2-AG (n=8). F de Fisher * $p < 0.05$.

En la figura 24 se muestra el efecto de la co-administración de dosis sub-efectivas del antagonista de receptores NMDA ketamina (0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y del endocannabinoide AEA (0.03 mg/kg) sobre el porcentaje de animales que presenta las distintas respuestas sexuales a las 24 horas post-saciedad. Se puede observar que la administración de cada fármaco por separado no afectó al porcentaje de animales sexualmente saciados que presentó las diferentes conductas. Por otro lado, cuando se administraron los tratamientos conjuntamente hubo una tendencia al aumento en los porcentajes de ratas saciadas que montaron, intromitieron y eyacularon que no alcanzó significancia estadística. Sin embargo, el aumento en el porcentaje de machos saciados que pudo reiniciar la cópula después de la eyaculación fue estadísticamente significativo. Por lo tanto, este tratamiento revirtió la saciedad sexual.

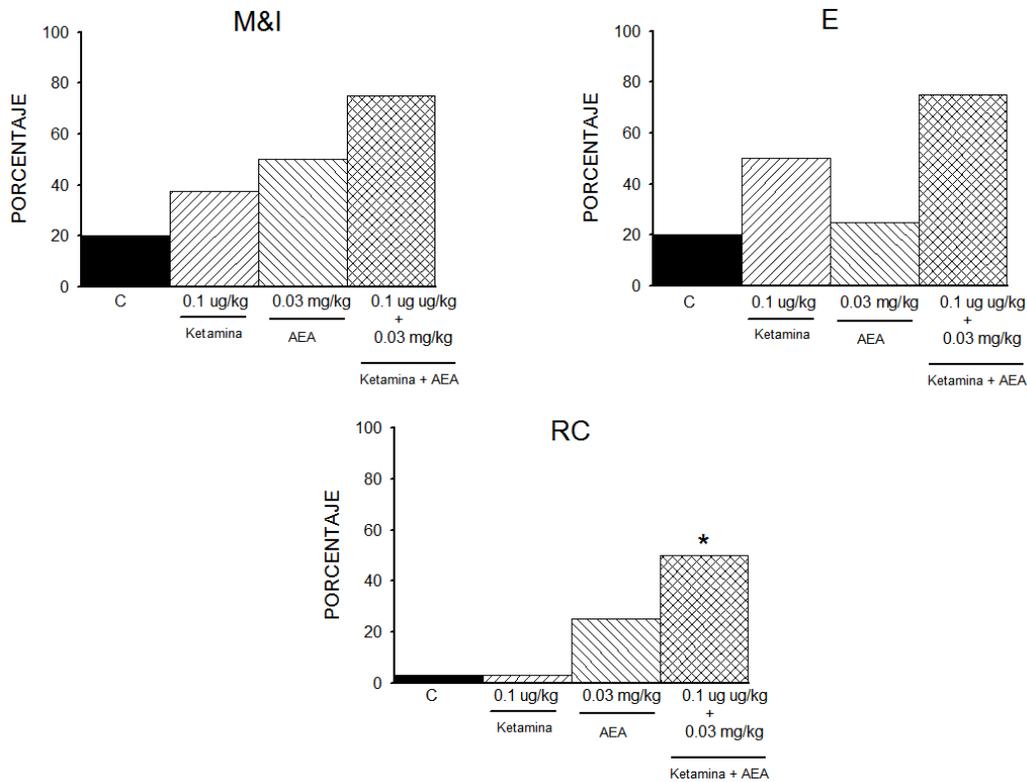


Figura 24. Porcentaje de ratas macho sexualmente saciadas que presenta las conductas de monta e intromisión (M & I), de eyaculación (E) y que reinicia que reinicia la cópula después de la eyaculación (RC) a las 24 horas post-saciedad, como respuesta al tratamiento con vehículo (n=10), 0.1 µg/kg de ketamina (n=8), 0.03 mg/kg de AEA (n=8) y la combinación de ketamina y AEA (n=8). F de Fisher * P < 0.05

En la figura 25 se muestra el efecto de la co-administración de dosis sub-efectivas de 2-AG (0.03 mg/kg) y del antagonista de receptores mGluR5 MPEP (0.01 mg/kg) sobre el porcentaje de ratas sexualmente exhaustas que presenta montas e intromisiones, que eyacula y que reinicia la cópula después de eyacular a las 24 horas post-saciedad. La dosis sub-efectiva de MPEP se escogió de una curva dosis respuesta realizada previamente en el laboratorio. Se observa que mientras ninguno de los fármacos tuvo efectos significativos por sí solos, la combinación de estos tratamientos incrementó significativamente el porcentaje de ratas sexualmente exhaustas que montó e intromitió ($p < 0.001$), eyaculó ($p < 0.01$) y que reinició la cópula después de eyacular ($p < 0.01$) al compararlos con el grupo control. El incremento en estos porcentajes también fue estadísticamente significativo al compararlos con la sola administración de 2-AG ($p < 0.01$).

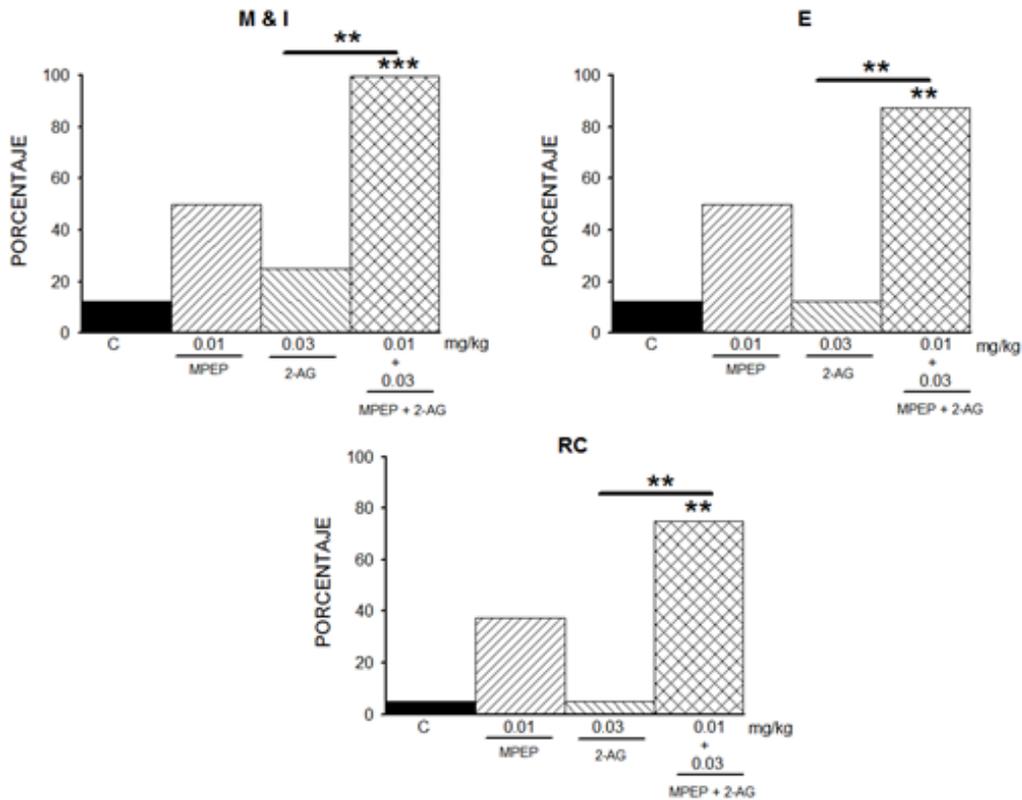


Figura 25. Porcentaje de ratas macho sexualmente saciadas que presenta las conductas de monta e intromisión (M&I), de eyacuación (E) y que reinicia la cópula después de la eyacuación (RC) a las 24 horas post-saciedad en respuesta al tratamiento con vehículo (n=8), 0.01 mg/kg de MPEP (n=8), 0.03 mg/kg de 2-AG (n=8) o la combinación de MPEP y 2-AG (n=8). F de Fisher **p<0.01; ***p< 0.001

En la figura 26 se muestra el efecto de la co-administración de dosis sub-efectivas del eCN AEA (0.03 mg/kg) y del antagonista de receptores mGluR5 MPEP (0.01 mg/kg) sobre el porcentaje de ratas sexualmente exhaustas que presenta montas e intromisiones, que eyacula y que reinicia la cópula después de eyacular a las 24 horas post-saciedad. Se observa que mientras por separado estos fármacos no modificaron significativamente el porcentaje de animales que realizó las diferentes conductas, cuando se administraron en conjunto, el porcentaje de machos que pudo reiniciar la cópula después de la eyacuación aumentó significativamente en comparación al grupo control ($p < 0.05$).

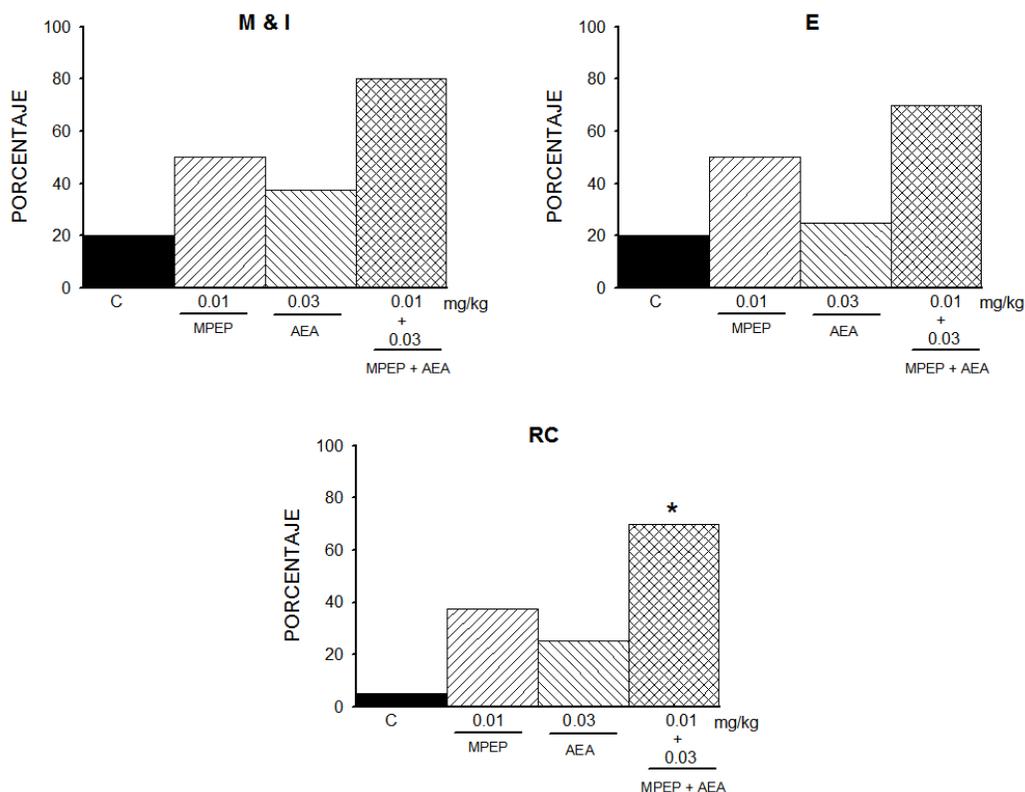


Figura 26. Porcentaje de ratas macho sexualmente saciadas que presenta las conductas de monta e intromisión (M & I), de eyaculación (E) y que reinicia la cópula después de la eyaculación (RC) a las 24 horas post-saciedad, como respuesta al tratamiento con vehículo (n=10), 0.01 mg/kg de MPEP (n=8), 0.03 mg/kg de AEA (n=8) y la combinación de MPEP y AEA (n=8). F de Fisher * $p < 0.05$

Se realizó una curva dosis-respuesta de los efectos del antagonista de receptores AMPA CNQX (0.01 a 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$) sobre la conducta sexual de ratas sexualmente exhaustas, para identificar una dosis sub-efectiva de este fármaco. Al igual que con la curva dosis-respuesta de ketamina, esta curva complementa la publicada en el trabajo de Rodríguez-Manzo (2015) e incluye dosis menores a las reportadas anteriormente (ver figura 10). En la figura 27 se puede observar que aún con dosis de hasta 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$, este fármaco continuó aumentando significativamente el porcentaje de animales que presentó las diferentes respuestas sexuales a las 24 horas post-saciedad.

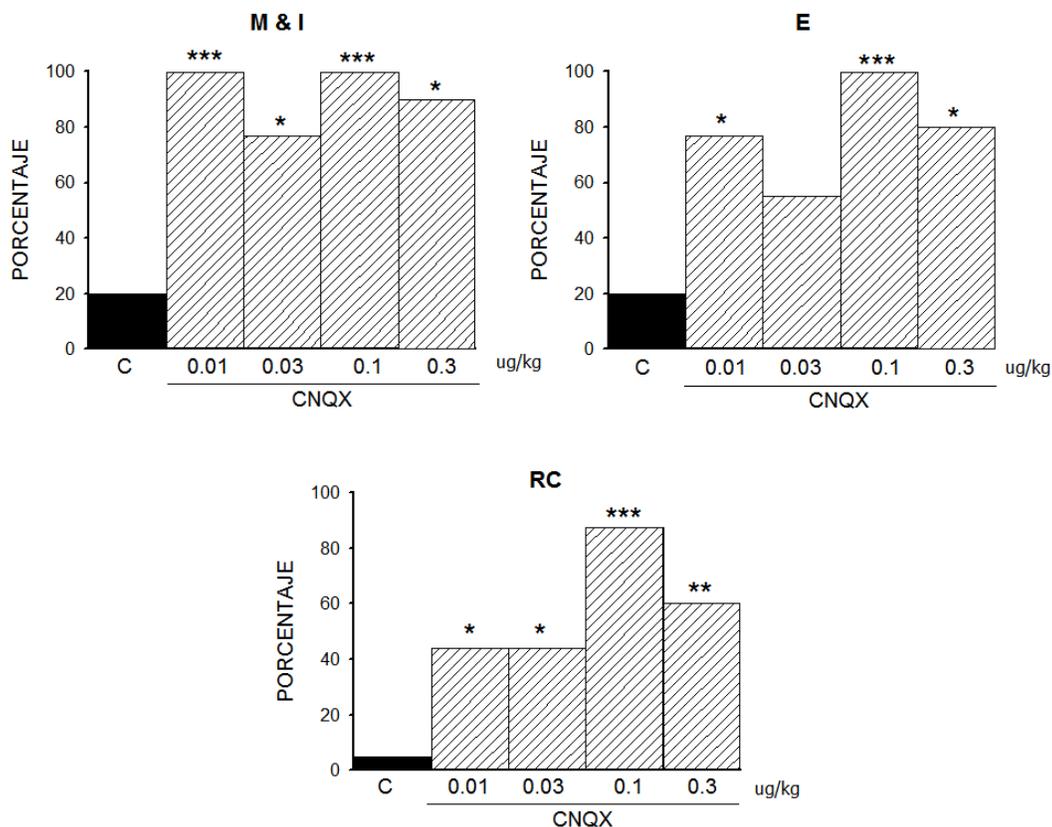


Figura 27. Efecto de diferentes dosis de CNQX (0.01- 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$; n=8), sobre el porcentaje de ratas sexualmente saciadas que presenta las conductas de monta e intromisión (M & I), de eyaculación (EC) y que reinicia la cópula después de la eyaculación (RC) a las 24 horas post-saciedad. F de Fisher: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

6.3. Interacción entre el 2-AG y el sistema glutamatérgico del ATV

Se realizó una curva dosis-respuesta de los efectos de la administración bilateral, intra-ATV, del agonista de receptores glutamatérgicos mGluR5 CHPG (30–3000 nM) sobre la cópula de ratas macho sexualmente saciadas, con el objetivo de identificar una concentración que no tuviera efecto sobre la conducta sexual de los animales sexualmente exhaustos. Como se puede observar en la figura 28 las tres concentraciones probadas (30, 300 y 3000 nM) carecieron de efecto significativo sobre los porcentajes de animales saciados que presentaron las distintas respuestas sexuales a las 24 horas post-saciedad. Decidimos utilizar la concentración más pequeña, de 30 nM, para el experimento de interacción

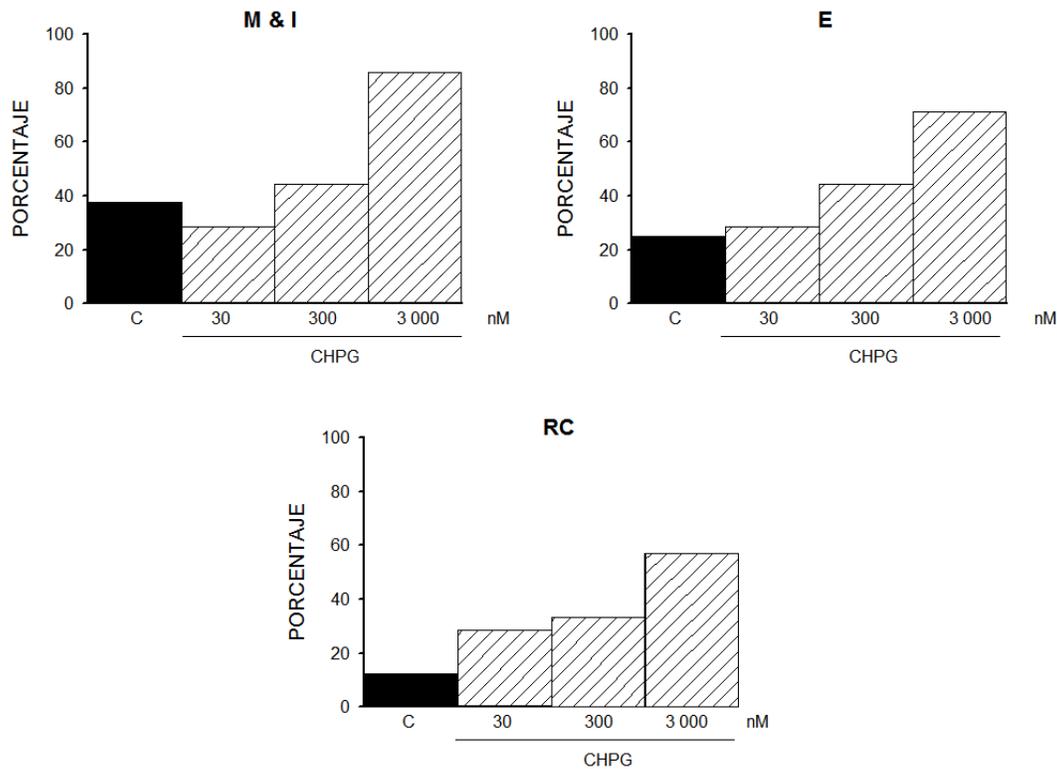


Figura 28. Efecto de diferentes concentraciones de CHPG (30 nM, n= 7; 300 nM, n = 9 y 3000 nM, n=7), sobre el porcentaje de ratas sexualmente saciadas que presenta las conductas de monta e intromisión (M & I), de eyaculación (E) y que reinicia la cópula después de la eyaculación (RC) a las 24 horas post-saciedad.

Por último, a un grupo animales sexualmente exhaustos, implantados, con cánulas dirigidas al ATV se le administró a las 24 horas post-saciedad una dosis de 0.3 mg/kg de 2-AG por vía i.p., seguida de la infusión de una concentración de 30nM de CHPG. En la figura 29 se muestra que la infusión intra-ATV de CHPG, que careció de efecto por sí misma, pero canceló la reversión de la saciedad sexual producida por la administración sistémica de una dosis efectiva de 2-AG, cuando ambos tratamientos se co-administraron.

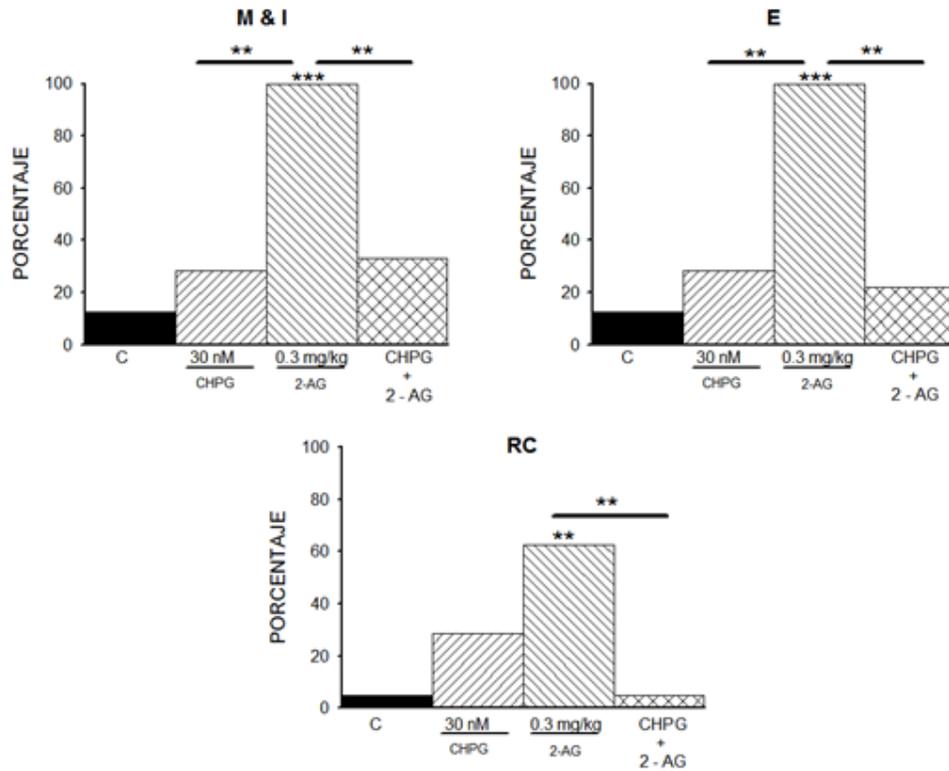


Figura 29. Porcentaje de ratas macho sexualmente saciadas que presenta las conductas de monta (M), intromisión (I), de eyaculación (E) y que reinicia de cópula después de la eyaculación (RC) a las 24 horas post-saciadad en respuesta al tratamiento con vehículo (n=8), CHPG (30 nM intra-ATV; n=7), 2-AG (0.3 mg/kg i.p.; n=8) o la combinación de CHPG y 2-AG (n=9). F de Fisher **p<0.01; *** p<0.001

7. Discusión

En este trabajo nos planteamos dos objetivos generales, por un lado, establecer si el 2-AG interactúa con el sistema dopaminérgico para revertir la saciedad sexual y, por otro lado, establecer si tanto el 2-AG como la AEA interactúan con el sistema glutamatérgico para producir este efecto.

7.1. Interacción del 2-AG con el sistema dopaminérgico para la reversión de la saciedad sexual.

Como se mencionó anteriormente, el SMD juega un papel importante en el control de los aspectos motivacionales y recompensantes de la cópula, mientras que el sistema eCN participa en la regulación de estos procesos al modular la actividad de las neuronas dopaminérgicas del SMD (Lupica et al., 2004; Gardner, 2005). En el ATV, los eCN se sintetizan en los somas de las neuronas dopaminérgicas y actúan como mensajeros retrógrados, activando receptores CB1 que se encuentran en las terminales GABAérgicas y glutamatérgicas en esa región cerebral, con lo cual inhiben la liberación de estos neurotransmisores, modulando así la actividad de las neuronas dopaminérgicas (Lupica et al., 2004; Gardner, 2005).

Diversos investigadores han demostrado la importancia de la DA en la expresión de la conducta sexual masculina (revisado en Hull & Rodríguez-Manzo, 2017). Se ha comprobado que al igual que con otros estímulos recompensantes, los niveles de DA en el NAcc aumentan en presencia de una hembra sexualmente receptiva, que representa un estímulo sexual. Los niveles de DA se elevan más durante la cópula, alcanzando un pico en una primera eyaculación, pero se mantienen elevados durante la cópula repetida (Fiorino et al, 1997). Durante una sesión de cópula hasta la saciedad, una vez que el animal cesa de presentar conducta sexual los niveles de DA tienden a regresar a niveles basales. A las 24 hrs post-saciedad, cuando la inhibición sexual está bien establecida, los niveles basales de DA están por debajo de los valores basales registrados antes de la cópula (Canseco-Alba, en preparación, ver figura 7).

Se ha establecido que la administración sistémica de agonistas de receptores dopaminérgicos facilita la cópula de animales expertos, mientras que antagonistas de receptores dopaminérgicos la deterioran (Hull & Rodríguez-Manzo, 2017). Por otro lado, en el laboratorio se ha investigado el papel de la DA en el fenómeno de saciedad sexual, encontrando que la administración sistémica del agonista de receptores dopaminérgicos apomorfinina revierte la inhibición sexual característica de la saciedad (Rodríguez-Manzo, 1999). Posteriormente se demostró que esta reversión ocurre a través de la estimulación de los receptores dopaminérgicos de la familia D1-Like y no de la familia D2-Like (Guadarrama-Bazante et al., 2014).

En el NAcc la DA actúa a través de receptores dopaminérgicos tanto de la familia D1-like, como de la familia D2-like que se encuentran expresados en las neuronas espinosas medias (MSN), que son de naturaleza GABAérgica y que conforman gran parte de los cuerpos neuronales del NAcc (Robison & Nestler, 2011). Se ha propuesto que los receptores de la familia D2-Like (acoplados a proteínas Gi) son más afines a la DA que los receptores de la familia D1-Like (acoplados a proteínas Gs) (Beaulieu & Gainetdinov, 2011) y, por lo tanto, los primeros se activan a concentraciones bajas de DA, como las generadas por la liberación tónica de DA en el NAcc. En cambio, los receptores dopaminérgicos D1-Like, requieren de una concentración mayor de DA para ser activados, como la generada por la liberación fásica de DA (Grace et al., 2007). Ahora bien, esta liberación fásica ocurre en presencia de un estímulo recompensante e interviene en la modulación de las conductas dirigidas a conseguir la recompensa (Berridge & Robinson, 1998; Grace et al., 2007).

Como se mencionó anteriormente, en los machos sexualmente saciados se ha encontrado que a las 24 horas post-saciedad, durante la etapa de inhibición de la conducta sexual, los niveles de DA en NAcc decaen por debajo de los niveles basales (Canseco-Alba et al., en preparación). Esto sugiere que la disminución en los niveles de DA en el NAcc pudiera jugar un papel en la incapacidad que tienen los animales sexualmente saciados de responder a la presencia de una hembra sexualmente receptiva. Los agonistas dopaminérgicos que actuarían en el NAcc en conjunto con los niveles bajos de DA de ratas saciadas permitirían alcanzar una activación de receptores

dopaminérgicos necesaria para la expresión de la cópula a las 24 horas post-saciedad, explicando así su capacidad para revertir la inhibición sexual.

En lo que respecta al sistema endocannabinoide, estudios previos han mostrado la importancia de estos neurotransmisores en los procesos de plasticidad sináptica en el SMD, como consecuencia de su activación por estímulos recompensantes (Luchicchi & Pistis, 2012). Los eCN que son sintetizados a demanda por las neuronas DA, proporcionan una modulación crítica en la actividad de las neuronas DA en el ATV mediante la regulación de diferentes formas de plasticidad sináptica, como son: a) la supresión de la inhibición inducida por despolarización (DSI), que causa una reducción en la amplitud de los potenciales post-sinápticos inhibitorios (IPSCs); b) la supresión de la excitación inducida por despolarización (DSE), que reduce drásticamente los potenciales post-sinápticos excitatorios (EPSCs), y c) la LTD dependiente de eCN, la cual disminuye la liberación de neurotransmisores (Alger, 2002; Wilson & Nicoll, 2002).

Datos del laboratorio han demostrado que dosis bajas del endocannabinoide AEA, administradas por vía sistémica, revierten la saciedad sexual (Canseco-Alba, 2011); además se comprobó que la administración de AEA directamente en el ATV también revierte la inhibición sexual de machos sexualmente saciados (Canseco-Alba & Rodríguez-Manzo, 2016). A pesar de estos importantes hallazgos, la literatura apunta a un papel crítico del eCN 2-AG en la modulación de la actividad de las neuronas DA en el ATV (Melis et al, 2011; Luchicchi & Pistis, 2012). Por esta razón, en el laboratorio se ha comenzado a investigar el papel del 2-AG en el fenómeno de saciedad sexual. Los primeros datos mostraron que dosis bajas de 2-AG también revierten la saciedad sexual (datos aún no publicados). Por último, un antecedente directo de este trabajo es el hallazgo de que en la reversión de la saciedad sexual por AEA está involucrado el sistema dopaminérgico, ya que el bloqueo de receptores dopaminérgicos con haloperidol cancela su efecto facilitador. Además, dosis sub-efectivas de AEA y apomorfina, tienen un efecto sinérgico cuando se administran en conjunto revirtiendo la inhibición sexual de los machos exhaustos (Canseco-Alba, 2016).

Con esto en mente, en esta investigación se encontró que dosis sub-efectivas del eCN 2-AG sinergizan con dosis sub-efectivas del agonista de receptores dopaminérgicos apomorfina para revertir la saciedad sexual y que la reversión de la saciedad sexual

producida por una dosis efectiva de 2-AG es bloqueada con un antagonista de receptores dopaminérgicos. Una posible interpretación de estos resultados estaría basada en la idea de que los eCNs administrados por vía sistémica actúen en el SMD, específicamente en el ATV, para revertir la saciedad sexual. Esta es una posibilidad real, dado que como ya mencionamos la infusión del eNC AEA directamente en el ATV de ratas sexualmente saciadas revierte la inhibición sexual (Canseco-Alba & Rodríguez-Manzo, 2016). Además, datos de la literatura indican que el 2-AG es un eCN que se sintetiza y actúa en el ATV para la regulación de la actividad de las neuronas DA (Melis et al, 2011).

La literatura nos muestra que después de una hiper-estimulación del SMD, la actividad de las terminales tanto GABAérgicas como glutamatérgicas del SMD se encuentra alterada, (van Huijstee & Mansvelder, 2015). Tenemos evidencia indirecta, dada por el mantenimiento de niveles elevados de DA extracelular durante el desarrollo de la saciedad sexual, de que la cópula hasta la saciedad podría producir también una hiper-estimulación del SMD. Adicionalmente, datos farmacológicos de nuestro laboratorio apuntan a que en las ratas sexualmente saciadas existen niveles altos de GABA y glutamato en el ATV (Rodríguez-Manzo, 2015; Rodríguez-Manzo & Canseco-Alba, 2017). Sobre esta base, podría pensarse que dosis de 2-AG, sub-efectivas para revertir la saciedad, activen algunos receptores CB1 de las terminales glutamatérgicas y/o GABAérgicas del ATV de animales sexualmente saciados, lo que daría como resultado una inhibición parcial de la liberación de GABA y/o de glutamato, suficiente para provocar un aumento ligero en la liberación de DA en NAcc, que se suma a la activación directa de los receptores dopaminérgicos del NAcc por la apomorfina. En conjunto, estos procesos producirían una activación de receptores DA del NAcc, suficiente para que las ratas saciadas presenten la conducta sexual frente a una hembra receptiva, que en los machos sexualmente saciados no pareciera representar un estímulo recompensante (Fig. 30). Por otro lado, la cancelación del efecto facilitador de dosis efectivas de 2-AG con el haloperidol se explicaría por el bloqueo de las acciones de la DA sobre sus receptores en el NAcc a pesar de haberse liberado en niveles adecuados como resultado de la inhibición de la liberación de GABA y/o glutamato en el ATV resultante de la activación de los receptores CB1 de las terminales GABAérgicas y glutamatérgicas de esta región cerebral (Fig. 31).

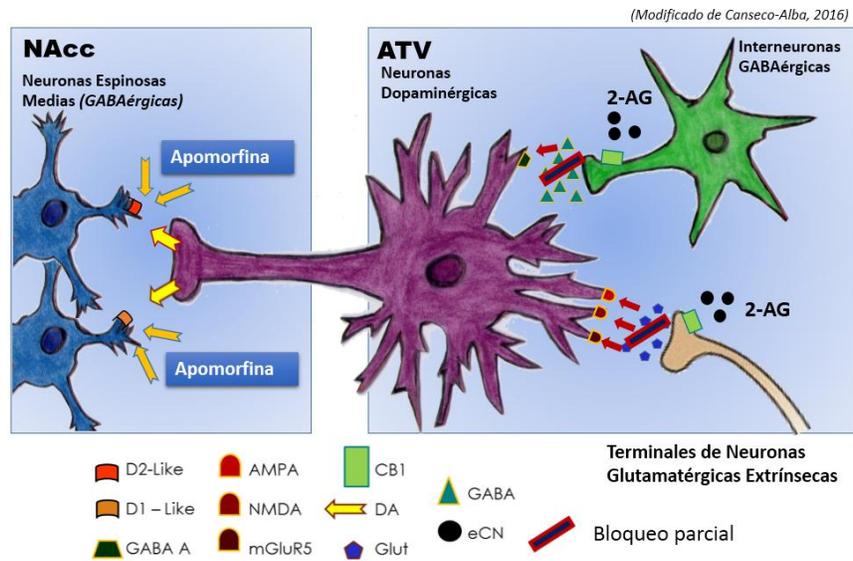


Figura 30. Esquema que ejemplifica lo que proponemos que ocurre en el SMD de ratas macho sexualmente saciadas, después de la co-administración de 2-AG y apomorfina. El 2-AG produce la inhibición parcial de la liberación de GABA y glutamato en el ATV, lo que activa a las neuronas DA que liberan una cierta cantidad de DA en el NAcc que activa receptores DA de las MSN. La apomorfina activa directamente a estos mismos receptores DA en el NAcc. En conjunto ambas señales producen la estimulación suficiente para que las ratas saciadas presenten la conducta sexual frente a una hembra receptiva.

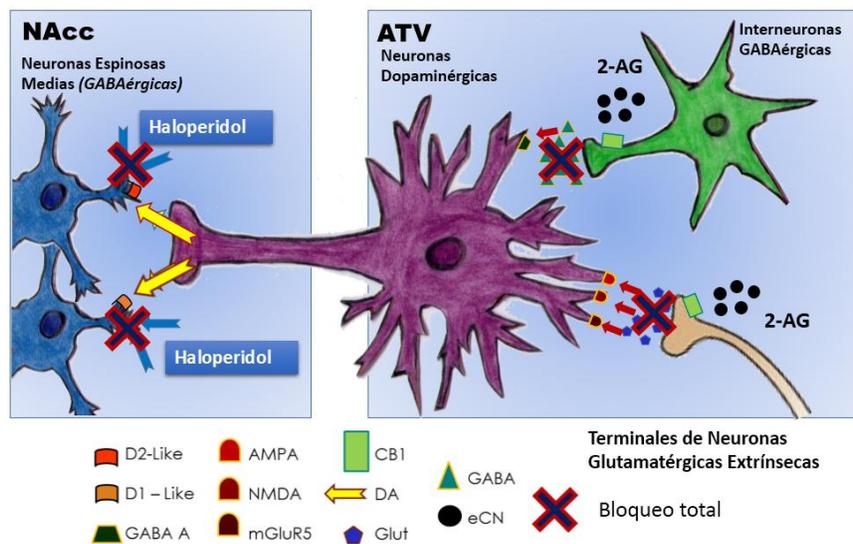


Figura 31. Esquema que muestra lo que se propone que ocurre en el SMD de ratas macho sexualmente saciadas después de la co-administración de una dosis efectiva de 2-AG con una dosis de haloperidol que no afecta a la cópula. El 2-AG inhibe la liberación tanto de GABA como de glutamato en el ATV lo que permite que la neurona libere DA en el NAcc. Sin embargo, el haloperidol bloquea a los receptores DA de las MSN por lo que la DA liberada no tiene donde actuar con lo que el efecto facilitador del 2-AG se bloquea, y la inhibición sexual en las ratas saciadas se mantiene.

Ambos resultados respaldan la idea postulada por nuestro laboratorio de que fármacos que actúan en diferentes sistemas de neurotransmisión para revertir la saciedad sexual tienen como vía final común la activación del sistema dopaminérgico (Rodríguez-Manzo, 1999). Además, podemos concluir que el 2-AG tiene un efecto facilitador sobre la cópula de animales sexualmente saciados, y que la DA participa en este efecto de manera similar a como lo hace con la AEA (Canseco-Alba et al., en preparación).

7.2. Interacción de los endocannabinoides con el sistema glutamatérgico para la reversión de la saciedad sexual.

En el laboratorio se ha investigado el papel que juegan distintos sistemas de neurotransmisión en el fenómeno de saciedad sexual a través de uso de diversos agonistas y antagonistas. Con esto se ha establecido que los sistemas noradrenérgico y serotoninérgico participan en la reversión de la saciedad sexual, pues el antagonista de receptores α 2-adrenérgicos, yohimbina, y el agonista de receptores 5-HT_{1A}, la 8-OH-DPAT, inducen la expresión de conducta sexual en machos sexualmente saciados (Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1994). Por otro lado, los antagonistas de receptores a opiodes tipo μ y δ (naloxona y naltrexona) revierten la inhibición sexual de ratas saciadas a dosis bajas (Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1994, Garduño-Gutiérrez et al., 2013). También se estableció que el sistema GABAérgico está involucrado en el proceso de saciedad sexual, pues dosis bajas del antagonista del receptor GABA-A, bicuculina, revierten la saciedad sexual (Rodríguez-Manzo & Canseco-Alba, 2017). Por último, recientemente se comprobó que el sistema glutamatérgico también está involucrado en el fenómeno de saciedad sexual, pues antagonistas específicos de receptores glutamatérgicos tipo NMDA, AMPA y mGluR5 revierten la saciedad sexual (Rodríguez-Manzo, 2015).

Hay que recordar que el glutamato es el neurotransmisor excitatorio por excelencia en el cerebro y es un mediador importante de la plasticidad sináptica que se requiere para que los organismos se adapten en un entorno cambiante (Parsons et al., 2005). En el SMD, las neuronas DA reciben influencia glutamatérgica de varias regiones del SNC

(especialmente de la CPF) y, a su vez, están provistas de receptores glutamatérgicos tanto ionotrópicos como metabotrópicos. El sistema glutamatérgico en el SMD está involucrado en el procesamiento de recompensas naturales. En presencia de un estímulo recompensante, las terminales glutamatérgicas del ATV liberan glutamato que actúa sobre sus receptores localizados en las neuronas DA, lo cual a su vez provoca un cambio en el tipo de la liberación de DA en el NAcc, de tónica a fásica (Grace et al, 2007; Kalivas et al., 2009; van Huijstee & Manvelder, 2015).

El glutamato juega este papel regulatorio en el funcionamiento normal del SMD, que es modificado por el consumo de drogas de abuso que sobre-activan al sistema causando cambios plásticos en las sinapsis del ATV (Kalivas et al., 2009; van Huijstee & Manvelder, 2015), mediados por los receptores a glutamato tipo AMPA, NMDA y mGluR5 (van Huijstee & Manvelder, 2015; Ferrada et al., 2017). Una sobre-activación del SMD también se presentaría durante el desarrollo de la cópula hasta la saciedad, por lo que es posible que se produzcan cambios plásticos mediados por receptores glutamatérgicos similares a los descritos para las drogas de abuso. De manera general, estos cambios incluyen modificaciones en la composición de las subunidades de los receptores NMDA y AMPA, así como cambios en los fenómenos de potenciación de largo plazo mediados por estos mismos receptores en el ATV que, en conjunto, dan por resultado modificaciones en la excitabilidad de las neuronas dopaminérgicas (van Huijstee & Manvelder, 2015; Mameli et al., 2011).

Por su parte, la activación del receptor mGluR5 regula directamente la actividad de las neuronas DA del ATV induciendo la liberación de DA. Esto lo hace a través de modular positivamente a los receptores NMDA y AMPA. Además, aunque no está totalmente demostrado, se ha postulado que el receptor mGluR5 también se encuentra localizado en las terminales glutamatérgicas, donde su activación produciría un aumento de la liberación de glutamato en el ATV, lo que propiciaría una mayor excitación de las neuronas DA (Ferrada et al, 2016).

En nuestro laboratorio se demostró que los receptores glutamatérgicos tipo AMPA, NMDA y mGluR5 están involucrados en el mantenimiento de la saciedad sexual, puesto que su bloqueo induce la expresión de la conducta copulatoria en los machos saciados. Pareciera que las ratas sexualmente exhaustas tienen un tono glutamatérgico aumentado

que contribuye a mantener la inhibición sexual característica de la saciedad (Rodríguez-Manzo, 2015).

En lo que respecta al sistema endocannabinoide, hay que recordar que en el ATV, los receptores CB1 se encuentran presentes tanto en las terminales de neuronas GABAérgicas como glutamatérgicas que hacen sinapsis con las neuronas DA, y que los eCN actúan sobre ellos inhibiendo la liberación de estos dos neurotransmisores (Lupica et al., 2004; Gardner, 2005). Se sabe que los eCN tienen efectos bifásicos en las ratas sexualmente saciadas, en las que dosis bajas tanto de AEA como de 2-AG, administradas por vía sistémica, revierten la saciedad sexual (Canseco-Alba y Rodríguez-Manzo, 2014). Sin embargo, no se conoce si los eCN interactúan con el sistema glutamatérgico para revertir este fenómeno de inhibición sexual, por lo que averiguarlo fue uno de los objetivos de este trabajo.

Los resultados obtenidos demuestran que dosis sub-efectivas de los dos endocannabinoides (2-AG y AEA) sinergizan con dosis sub-efectivas del antagonista de receptores glutamatérgicos tipo NMDA, ketamina, o del antagonista de receptores tipo mGluR5, MPEP, para revertir la saciedad sexual. Este hecho nos lleva a proponer que la activación de los receptores CB1 de las terminales por ambos eCNs interfiere parcialmente con la transmisión glutamatérgica del ATV. Esto, a la par del bloqueo parcial de los receptores NMDA o mGluR5 localizados en las neuronas dopaminérgicas por la acción de los antagonistas, llevaría a lograr una interrupción de los efectos del glutamato suficiente para revertir la inhibición sexual característica de la saciedad (Fig. 32).

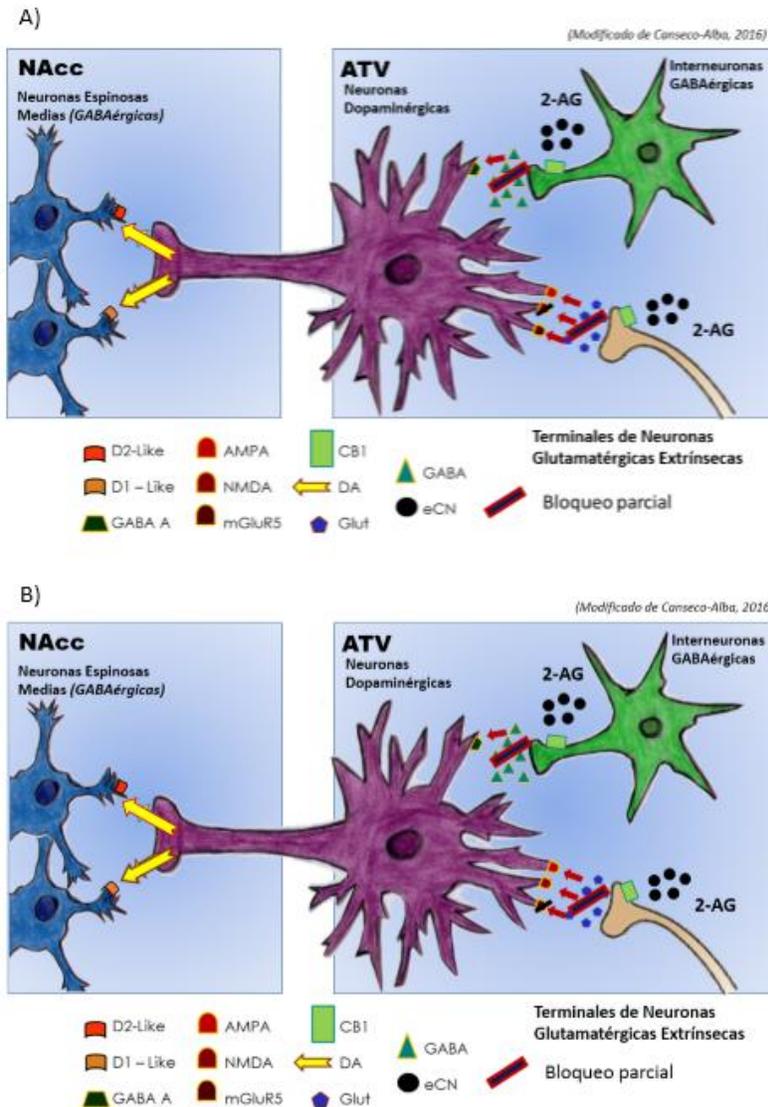


Figura 32. Esquema que ejemplifica la propuesta del mecanismo a través del cual la co-administración de eCNs (AEA ó 2-AG) con A) antagonistas de receptores glutamatérgicos NMDA Ketamina, y B) el antagonista de receptores glutamatergicos mGluR5 MPEP, actúa en el SMD de ratas macho sexualmente exhaustas para revertir la saciedad. Por un lado el 2-AG ó la AEA produce una inhibición parcial en la liberación de glutamato y GABA en el ATV, mientras que el bloqueo parcial de de receptores NMDA o mGluR5 provoca una interrupción de los efectos del glutamato en las neuronas DA del ATV. La suma de las acciones del eCN y el antagonista glutamatérgico produce un aumento de DA en Nacc suficiente para que las ratas presenten la conducta sexual frente a una hembra receptiva.

Los datos obtenidos también nos permitieron establecer que el eCN 2-AG tiene un mejor efecto en la reversión de la saciedad sexual que la AEA cuando estos eCN se co-administran con antagonistas de receptores glutamatérgicos, pues la proporción de animales sexualmente saciados que reinicia la cópula después de la eyaculación es mayor en las combinaciones con 2-AG, que en aquellas con AEA. Estos datos son consistentes con la literatura, que reporta que en el ATV el 2-AG es un modulador de la transmisión sináptica excitatoria mucho más fino que la AEA, excitación que modula el patrón de disparo de las neuronas DA (Melis et al, 2004).

Los resultados obtenidos en los animales sexualmente saciados sugieren que la activación de los receptores AMPA tiene un papel importante en los cambios plásticos inducidos por una sobre-estimulación glutamatérgica (van Huijstee & Mansvelder, 2015), puesto que dosis muy pequeñas (del orden de 0.01 µg/kg) del antagonista de receptores AMPA, el CNQX son todavía capaces de revertir la inhibición sexual de ratas sexualmente exhaustas (ver figura 27), lo que muestra una sensibilidad extrema de las respuestas mediadas por receptores AMPA. Este fenómeno pudiera ser explicado por el aumento en la proporción de receptores AMPA / NMDA y el fenómeno de LTP mediado por receptores AMPA que se ha documentado que ocurren como resultado de la hiper-estimulación glutamatérgica en el ATV (van Huijstee & Mansvelder, 2015).

Por otro lado, a pesar de haber encontrado aumentos estadísticamente significativos en la proporción de animales sexualmente exhaustos en los que se revirtió la saciedad con la co-administración de los antagonistas de receptores NMDA o mGluR5 con ambos eCNs, el porcentaje de animales que reinició la cópula después de eyacular fue mayor con las combinaciones de cada uno de los eCN con el antagonista de receptores mGluR5, que con el antagonista de receptores NMDA. Se ha demostrado que los receptores mGluR5 tienen un papel importante en la regulación de la actividad neural en el ATV al modular positivamente tanto la activación de receptores NMDA y AMPA en la neurona post-sináptica, así como la liberación de glutamato de las terminales pre-sinápticas, con lo cual el receptor mGluR5 también podría estar participando en los cambios plásticos mediados por receptores NMDA y AMPA que ocurren en las neuronas DA como resultado de una estimulación glutamatérgica incrementada (Ferrada et al, 2017). Sin embargo, habrá que hacer estudios específicos dirigidos a comprobarlo.

7.3. Interacción entre el 2-AG y el sistema glutamatérgico en el ATV

Por último, para establecer si la interacción entre el sistema glutamatérgico y el sistema endocannabinode documentada en este trabajo puede ocurrir en el ATV, se realizó un experimento dirigido a tratar de cancelar la reversión de la saciedad sexual producida por la administración sistémica de dosis efectivas de 2-AG, activando receptores glutamatérgicos mGluR5 directamente en el ATV. Los resultados del experimento demostraron que la activación de receptores mGluR5 en el ATV cancela la reversión de la saciedad producida por el 2-AG, lo que sugiere que dicha reversión se debe a que el 2-AG bloquea la liberación de glutamato en el ATV. El CHPG al activar a los receptores mGluR5 localizados en las neuronas DA restituiría el efecto estimulante del glutamato, que aparentemente contribuye a mantener la inhibición sexual de las ratas saciadas. Estos datos apoyan la propuesta de que la interacción entre los eCN y el glutamato para la reversión de la saciedad sexual tiene lugar en el ATV (Fig. 33).

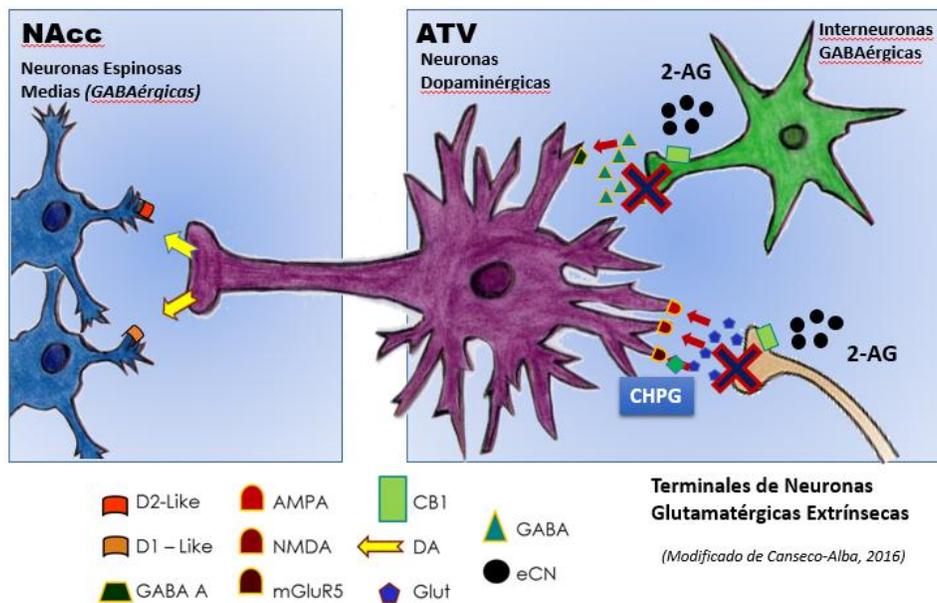


Figura 33. Esquema que muestra lo que se propone que ocurre en el SMD de ratas macho sexualmente saciadas después de la administración i.p. de 2-AG junto con el agonista mGluR5 CHPG por vía intra-ATV. Si bien el 2-AG bloquearía la liberación de glutamato y de GABA en el ATV, el CHPG al activar a los receptores mGluR5 localizados en las neuronas DA mantendría parte del efecto estimulante del glutamato que aparentemente contribuye a mantener la inhibición sexual de las ratas saciadas.

En conjunto, los datos obtenidos en este trabajo nos permiten proponer que durante el periodo de inhibición de la conducta sexual que presentan los animales sexualmente saciados, la transmisión glutamatérgica del ATV se encuentra alterada. Por un lado, tenemos evidencia de la existencia de un tono glutamatérgico elevado, que podría sumarse a una posible modificación en la señalización glutamatérgica, dada por la hiperactivación de las neuronas DA durante la cópula hasta la saciedad, que provocaría que éstas no liberen DA de manera fásica en presencia de un estímulo recompensante. Además, podemos afirmar que existe una interacción entre el sistema eCN y el sistema glutamatérgico para la reversión de la saciedad sexual, en donde probablemente los eCN inhiban la transmisión glutamatérgica de manera tal que permita a los receptores glutamatérgicos, cuyo funcionamiento estaría alterado, alcanzar el umbral de activación necesario para que las neuronas DA liberen su neurotransmisor de manera fásica en el NAcc en presencia de la hembra sexualmente receptiva, lo que se traduciría en la reversión de la saciedad sexual.

8. Conclusiones

Los resultados de este trabajo de investigación nos permiten concluir que:

1. El eCN 2-AG interactúa con el sistema dopaminérgico para revertir la saciedad sexual
2. Los eCN AEA y 2-AG interactúan con el sistema glutamatérgico, a través de los receptores NMDA y mGluR5, para revertir la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas.
3. El bloqueo parcial de receptores glutamatérgicos tiene mejor efecto para revertir la saciedad sexual cuando actúa en conjunto con el 2-AG que cuando lo hace con la AEA.
4. En los animales sexualmente exhaustos los receptores AMPA presentan una sensibilidad incrementada que permite su activación con dosis muy pequeñas de sus antagonistas, lo que sugiere que su composición puede haber cambiado.

9. Perspectivas.

Con base en los resultados de esta investigación, el comportamiento de los diferentes sistemas de neurotransmisión en el SMD durante el fenómeno de saciedad sexual puede seguir investigándose a partir de las siguientes aproximaciones:

- Para profundizar en la relación que existe entre el 2-AG y el sistema dopaminérgico, investigar a través de qué familia de receptores dopaminérgicos participa la DA en los efectos facilitadores que produce el 2-AG sobre la cópula.
- Continuar con la curva dosis respuesta del antagonista glutamatérgico AMPA CNQX para encontrar la dosis sub-efectiva y así poder determinar cuál es la relación entre este tipo de receptores glutamatérgicos y el sistema eCN.
- Medir las concentraciones de glutamato en el ATV de animales saciados a las 24 horas post-saciedad, lo que nos permitiría confirmar la existencia de un tono glutamatérgico elevado en estos animales
- Estudiar por técnicas electrofisiológicas cambios en la actividad de las neuronas DA en respuesta al bloqueo de receptores glutamatérgicos AMPA, NMDA y mGluR5

10. REFERENCIAS.

Ahlenius, S. & Larsson, K. (1990). Effects of selective dopamine D1 and D2 antagonists on male rat sexual behavior. *Experientia*, 46: 1026-1028.

Alger, B. (2002). Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Progress in Neurobiology*, 68: 247 – 286.

Argilli, E., Sibley, D. R., Malenka, R. C., England, P. M. & Bonci A. (2008). Mechanism and time course of cocaine-induced long-term potentiation in the Ventral Tegmental area. *Journal of Neuroscience*, 28: 9092–9100.

Ameri, A. (1999). The effects of cannabinoids on the brain. *Progress in Neurobiology*, 58: 315-348.

Ashton, J. C., Friberg, D., Darlington, C.L. & Smith, P. F. (2006). Expression of the cannabinoid CB2 receptor in the rat cerebellum: an immunohistochemical study. *Neuroscience Letters*, 396:113–116

Balfour, M., Yu, L & Coolen, L. (2004). Sexual behavior and sex-associated environmental cues activate the mesolimbic system in male rats. *Neuropsychopharmacology*, 29: 718 – 730.

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: 1259–1276.

Barfield, R. J. & Geyer, L. A. (1975). The ultrasonic postejaculatory vocalization and the postejaculatory refractory period of the male rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 88: 723–734.

Bayer, V. E. & Pickel, V. M. (1991). GABA-labeled terminals form proportionally more synapses with dopaminergic neurons containing low densities of tyrosine hydroxylase-immunoreactivity in rat ventral tegmental area. *Brain Research*, 559: 44-55.

Beach, F. A. & Jordan, L. (1956). Sexual exhaustion and recovery in the male rat. *Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 8: 121–133.

Beaulieu, J. M. & Gainetdinov, R. R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological reviews*, 63: 182-217.

Beck, J., Bialy, M. & Kostowski, W. (2002). Effects of D(1) receptor agonist SKF 38393 on male rat sexual behavior and postcopulatory departure in the goal compartment runway paradigm. *Physiology & behavior*, 76: 91-97.

Bellone, C. & Lüscher, C. (2006). Cocaine triggered AMPA receptor redistribution is reversed in vivo by mGluR-dependent long-term depression. *Nature Neuroscience*, 9: 636 – 641

Berridge, K. C. & Robinson, T. E. (1998). What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain research. Brain research reviews*, 28: 309-369.

Berridge, K. C. (2004). Motivation concepts in behavioral neuroscience. *Physiology & behavior*, 81: 179-209.

Berridge, K. C. (2007). The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology*, 191: 391–431.

Beyer, C., Contreras, J. L., Moralí, G. & Larsson, K. (1981). Effects of castration and sex steroid treatment on the motor copulatory pattern of the rat. *Physiology & Behavior*, 27: 727-773.

Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Marchand, J., Canat, X., Bourrie, B., Rinaldi-Carmona, M., Calandra, B., Le Fur, G. and Casellas, P. (1996). Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *European Journal of Biochemistry*, 237: 704 – 711.

Brown, E., Brown, G. M., Kofman, O. & Quarrington, B. (1978). Sexual function and affect in Parkinsonian men treated with L-dopa. *The American journal of psychiatry*, 135: 1552 –1555.

Canseco-Alba, A. & Rodríguez-Manzo, G. (2014). Low anandamide doses facilitate male rat sexual behaviour through the activation of CB1 receptors. *Psychopharmacology*, 231: 4071–4080.

Canseco-Alba, A. & Rodríguez-Manzo, G. (2016). Intra-VTA anandamide infusion produces dose-based biphasic effects on male rat sexual behavior expression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 150-151: 182-189.

Canseco-Alba A. G. (2011). Caracterización del papel de los endocannabinoides en la expresión de la conducta sexual masculina en ratas (Tesis de Maestría). Centro de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.

Canseco-Alba, A. G. (2016). Los endocannabinoides y la expresión de la conducta sexual masculina de la rata: papel del Sistema mesolímbico dopaminérgico (Tesis de Doctorado). Centro de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.

Chiamulera, C., Epping-Jordan, M. P., Zocchi, A., Marcon, C., Cottiny, C., Tacconi, S., Corsi, M., Orzi, F. & Conquet, F. (2001). Reinforcing and locomotor stimulant effects of cocaine are absent in mGluR5 null mutant mice. *Nature Neuroscience*, 4: 873–874.

Curtis H. & Barnes N. (1993). *Biología* 5° Edición. Argentina. Editorial Medica Panamericana.

Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, A. L., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A. & Mechoulam, R. (1992). Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor. *Science*, 258: 1946-1949.

Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J. C. & Piomelli, D. (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, 372: 686 – 691

Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T. & De Petrocellis, L. (1998). Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends in Neurosciences*, 21: 521-528.

Di Marzo, V. & Matias, I. (2005). Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nature neuroscience*, 8: 585-589.

Dominguez, J. M. & Hull, E. M. (2005). Dopamine, the medial preoptic area, and male sexual behavior. *Physiology & Behavior*; 86: 356 – 368

Dominguez, M. J., Gil, M & Hull E. M. (2006). Preoptic Glutamate Facilitates Male Sexual Behavior. *Journal of Neuroscience*, 26: 1699 –1703.

Dominguez, J. M. (2009). A role for preoptic glutamate in the regulation of male reproductive behavior. *Neuroscientist*, 15: 11–19.

Domjan, M. (1999) *Principios de aprendizaje y conducta*. International Thomson Editores, México.

Felder, C. C., Joyce, K. E., Briley, E. M., Mansouri, J., Mackie, K., Blond, O., Lai, Y., Ma, L. A. and Mitchell, R. L. (1995). Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Molecular Pharmacology*, 38: 433 – 450.

Ferrada, C., Sotomayor-Záratab, 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: 28 – 34.

Ferrari, F. & Giuliani, D. (1995). Sexual attraction and copulation in male rats: effects of the dopamine agonist SND 919. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 50: 29-34.

Fiorino, D. F., Coury, A., Roldán-Roldán, F. & Phillips, A. G. (1997). Dynamic changes in nucleus accumbens dopamine efflux during the Coolidge effect in male rats. *Journal of Neuroscience*, 17: 4849-4855.

Fride, E. (2002). Endocannabinoids in the central nervous system--an overview. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, 66: 221-233.

Fitzgerald, M., Shobin, E. & Pickel, V. M. (2012). Cannabinoid modulation of the dopaminergic circuitry: Implications for limbic and striatal output. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 38: 21 – 29.

Freund, T. F., Powell, J. F. & Smith, A. D. (1984). Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neuroscience*, 13: 1189-1215.

Freund, T. F., Katona, I. & Piomelli, D. (2003). Role of Endogenous Cannabinoids in Synaptic Signaling. *Physiological Reviews*, 83: 1017 – 1066.

Fu, J., Bottegoni, G., Sasso, O., Bertorelli, R., Rocchia, W., Masetti, M., Guijarro, A., Lodola, A., Armirotti, A., Garau, G., Bandiera, T., Reggiani, A., Mor, M., Cavalli, A. & Piomelli D. (2012). A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons. *Nature Neuroscience*, 15: 64–69

Gaetani, S., DiPasquale, P., Romano, A., Righetti, L., Cassano, T., Piomelli, D. & Cuomo, D. (2009). The endocannabinoid system as a target for novel anxiolytic and antidepressant drugs. *International Review of Neurobiology*, 85: 57–72.

Gardner, E. (2002). Addictive potential of cannabinoids: the underlying neurobiology. *Chemistry and Physics of Lipids*, 121: 267-290.

Gardner, E. L. (2005). Endocannabinoid signaling system and brain reward: emphasis on dopamine. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 81: 263-284.

Garduño-Gutierrez, R., Guadarrama-Bazante, L., Leon-Olea, M. & Rodriguez-Manzo, G. (2013). Endogenous opioids mediate the sexual inhibition but not the drug hypersensitivity induced by sexual satiation in male rats. *Behavioral neuroscience*, 127: 458-464.

Gorzalka, B. B., Morrish, A. C. & Hill, M. N. (2008). Endocannabinoid modulation of male rat sexual behavior. *Psychopharmacology*, 198: 479-486.

Grace, A. A. & Onn, S. P. (1989). Morphology and electrophysiological properties of immunocytochemically identified rat dopamine neurons recorded in vitro. *Journal of Neuroscience*, 9: 3463-3481.

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: 220-227.

Guadarrama-Bazante, I. L., Canseco-Alba, A. & Rodriguez-Manzo, G. (2014). Dopamine receptors play distinct roles in sexual behavior expression of rats with a different sexual motivational tone. *Behavioural pharmacology*, 25: 684-694.

Herkenham, M., Lynn, A. B., Little, M. D., Johnson, M. R. & Melvin, L. S. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *PNAS*, 87: 1932–1936

Howlett, A. C. (1998). The CB1 cannabinoid receptor in the brain. *Neurobiology of Disease*, 5: 405 – 416.

Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P. (2002). Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacology Review*, 54: 161–202

Hull, E. M., Lorrain, D. S., Du, J., Matuszewich, L., Lumley, L. A., Putnam, S. K. & Moses, J. (1999). Hormone-neurotransmitter interactions in the control of sexual behavior. *Behavioural brain research*, 105: 105-116.

Hull, E. M., Meisel, R. L. & Sachs, B. D. (2002). Male sexual behavior. En: Pfaff, D. W., Arnold A. P., Etgen, A. M., Fahrbach, S. E. & Rubin, R. T. (Editores). *Hormones, Brain and Behavior*. Academic Press. San Diego. pp. 3–137.

Hull, E. M. & Rodríguez-Manzo, G. (2009). Male Sexual Behavior. En: Donald W. Pfaff, Arthur P. Arnold, Anne M. Etgen, Susan E. Fahrbach and Robert T. Rubin (Editores).

Hormones, Brain and Behavior. 2nd edition, Vol. 1, Chap. 1. San Diego: Academic Press. pp. 5-65.

Hull, E. M. & Rodríguez-Manzo, G. (2017). Male Sexual Behavior. En: Donald W. Pfaff, Arthur P. Arnold, Anne M. Etgen, Susan E. Fahrbach and Robert T. Rubin (Editores). Hormones, Brain and Behavior. 3rd edition, Vol. 1, Chap. 1. San Diego: Academic Press. pp. 1-57.

Jenkins R. B. & Groh R. H. (1970). Mental symptoms in Parkinsonian patients treated with l-dopa. *Lancet*, 2: 177 – 179.

Jhou, T. C., Fields, H. L., Baxter, M. G., Saper, C. B. & Holland, P. C. (2009). The rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to midbrain dopamine neurons, encodes aversive stimuli and inhibits motor responses. *Neuron*, 61:786-800.

Johnson, S. W. & North, R. A. (1992). Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *The Journal of Neuroscience*, 12: 483–488.

Kalivas, P. W., Lalumiere, R. T., Knackstedt, L. & Shen H. (2009). Glutamate transmission in addiction. *Neuropharmacology*, 56: 169–173.

Karler, R., Calder, L. D., Chaudhry, I. A. & Turkanis, S. A. (1989). Blockade of “reverse tolerance” to cocaine and amphetamine by MK-801. *Life Science*, 45:599–606.

Kelley, A. & Berridge, K. (2002). The Neuroscience of Natural Rewards: Relevance to Addictive Drugs. *The Journal of Neuroscience*, 22: 3306 – 3311.

Kondo, S., Kondo, H., Nakane, S., Kodaka, T., Tokumura, A., Waku, K., (1998). 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor agonist: identification as one of the major species of monoacylglycerols in various rat tissues, and evidence for its generation through Ca²⁺-dependent and -independent mechanisms. *FEBS Letter*, 429: 152– 156.

Larsson, K (1956). Conditioning and sexual behavior in the male albino rat. Stockholm: Almqvist and Wiksell, 269.

Larsson, K. & Ahlenius, S. (1999). Brain and sexual behavior. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 877: 292-308.

Liu, J., Wang, L., Harver-White, J., Osei-Hyiaman, D., Razdan, R., Gong, Q., Chan, A. C., Zhou, Z., Huang, B. X., Kim, H. Y. & Kunos, G. (2006). A biosynthetic pathway for

anandamide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 13345 – 13350.

Lobb, C. J., Wilson, C. J. & Paladini, C. A. (2010). A dynamic role for GABA receptors on the firing pattern of midbrain dopaminergic neurons. *Journal of Neurophysiology*, 104: 403-413.

Lobb, C. J., Troyer, T. W., Wilson, C. J. & Paladini C. A. (2011). Disinhibition bursting of dopaminergic neurons. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5: 1–8.

Lopez, H. H. & Ettenberg, A. (2001). Dopamine antagonism attenuates the unconditioned incentive value of estrous female cues. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 68, 411-416.

Lupica, C.R., Riegel, A.C. & Hoffman, A.F. (2004). Marijuana and cannabinoid regulation of brain reward circuits. *British journal of pharmacology*, 143: 227-234.

Luchicchi A. & Pistis M. (2012). Anandamide and 2-arachidonoylglycerol: Pharmacological Properties, Functional Features, and Emerging Specificities of the Two Major Endocannabinoids. *Molecular Neurobiology*, 46: 374 – 392.

Mackie, K., Devane, W. A. & Hille, B. (1993). Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells. *Molecular Pharmacology*, 44:498-503.

Marsicano, G. & Chaouloff, F. (2012). Moving bliss: a new anandamide transporter. *Nature Neuroscience*, 15: 5–6.

Mameli, M., Bellone, C., Brown, M. T. C. & Lüscher C. (2011). Cocaine inverts rules for synaptic plasticity of glutamate transmission in the ventral tegmental area. *Nature Neuroscience*, 14: 414–416.

Marinelli, M., Rudick, C. N., Hu, X. T. & White, F. J. (2006). Excitability of dopamine neurons: modulation and physiological consequences. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 5:79-97.

Margolis, E. B., Lock, H., Hjelmstad, G. O., & Fields, H. L. (2006). The ventral tegmental area revisited: is there an electrophysiological marker for dopaminergic neurons? *The Journal of Physiology*, 577: 907–924.

Martinez-Gonzalez, D., Bonilla-Jaime, H., Morales-Otal, A., Henriksen, S. J., Velazquez Moctezuma, J. & Prospero-Garcia, O. (2004). Oleamide and anandamide effects on food intake and sexual behavior of rats. *Neuroscience letters*, 364: 1-6.

Mechoulam, R. & Fride, E. (1995). The unpaved road to the endogenous brain cannabinoid ligands, the anandamides. En: Pertwee, R. G. (Editor). *Cannabinoid Receptors*. Academic Press, Londres. pp. 233–258.

Mechoulam R. & Parker L. (2013). The Endocannabinoid System in the Brain. *Annual Review of Psychology*, 64: 21-47.

Mechoulam R. (1986). The pharmacohistory of *Cannabis sativa*. En *Cannabinoids as Therapeutic Agents*, Mechoulam, R. (Ed). Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 1–19.

Melis, M., Perra, S., Muntoni, A. L., Pillolla, G., Lutz, B., Marsicano, G., Di Marzo, V., Gessa, G. L. & Pistis M. (2004). Prefrontal cortex stimulation induces 2-arachidonoyl-glycerol-mediated suppression of excitation in dopamine neurons. *The Journal of Neuroscience*, 24: 10707–10715

Melis, M., Muntoni, A. L., & Pistis, M. (2012). Endocannabinoids and the Processing of Value-Related Signals. *Frontiers in Pharmacology*, 3, 7.

Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M. & Caron, M. G. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological reviews*, 78: 189-225.

Mones, R. J., Elizan, T. S. & Siegel, G. J. (1970). Evaluation of L-dopa therapy in Parkinson's disease. *New York State Journal of Medicine*, 70: 2309 – 2318.

Morikawa, H & Paladini, C. A. (2011). Dynamic regulation of midbrain dopamine neuron activity: intrinsic, synaptic, and plasticity mechanisms *Neuroscience*. 159:95-111.

Murphy, L.L., Gher, J., Steger, R.W. & Bartke, A. (1994). Effects of delta 9-tetrahydrocannabinol on copulatory behavior and neuroendocrine responses of male rats to female conspecifics. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 48: 1011-1017.

Omelchenko, N. & Sesack, S. R. (2009). Ultrastructural analysis of local collaterals of rat ventral tegmental area neurons: GABA phenotype and synapses onto dopamine and GABA cells. *Synapse*, 63:895-906.

Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Gong, J. P., Patel, S. & Meozzi, P. A. (2008). Functional expression of brain neuronal CB2 cannabinoid receptors are involved in the effects of

drugs of abuse and in depression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1139: 434–449

Pacher, P. & Mechoulam, R. (2011). Is lipid signaling through cannabinoid 2 receptors part of a protective system? *Progress in Lipid Research*, 50: 193–211.

Parsons, C. G., Danysz, W. & Zieglgansberger, W. (2005). En: Holsboer, F., Stro"hle, A. (Eds.), *Anxiety and Anxiolytic Drugs. Handbook of Experimental Pharmacology. Excitatory amino acid neurotransmission*, vol. 169. Springer, pp. 249–303.

Paxinos, G. & Watson, C. (2009). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press.

Pfaus, J. G. & Gorzalka, B. B. (1987). Opioids and sexual behavior. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 11: 1-34.

Pfaus, J. G., Damsma, G., Wenkstern, D. G., Blaha, C. D., Phillips, A.G. & Fibiger, H. C. (1990). Sexual behavior enhances central dopamine transmission in the rat. *Brain Research*, 530: 345–348.

Pierce, R.C., Bell, K., Duffy, P. & Kalivas, P. W. (1996). Repeated cocaine augments excitatory amino acid transmission in the nucleus accumbens only in rats having developed behavioral sensitization. *Journal of Neuroscience*, 16: 1550 – 1560.

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*, 2012.

Prescott, S. M. & Majerus, P. W. (1983). Characterization of 1, 2-diacylglycerol hydrolysis in human platelets. Demonstration of an arachidonoyl-monoacylglycerol intermediate. *The journal of biological chemistry*, 25: 764-769.

Rang, H. P., Dale, M. M. Ritter, J. M. Flower, R. J. (2008). *Rang y Dale: Farmacología*. Elsevier, Barcelona. pp. 479 – 487.

Roche, M. & Finn, D. (2010). Brain CB2 Receptors: Implications for Neuropsychiatric Disorders. *Pharmaceuticals*, 3: 2517 – 25533.

Reeve, J. (1999) *Motivación y emoción*. Mc Graw Hill, Madrid.

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: 11070 – 11078.

Rodríguez-Manzo, G. & Fernández-Guasti, A. (1994). Reversal of sexual exhaustion by serotonergic and noradrenergic agents. *Behavioural Brain Research*, 62: 127-134.

Rodríguez-Manzo, G & Fernández-Guasti, A. (1995). Opioid antagonists and the sexual satiation phenomenon. *Psychopharmacology*, 122: 131-136

Rodríguez-Manzo, G., Guadarrama-Bazante, I. L. & Morales-Calderon, 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: 253–260.

Rodríguez-Manzo & Canseco-Alba (2017). A new role for GABAergic transmission in the control of male rat sexual behavior expression. *Behavioural Brain Research*, 320: 21 - 29.

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, 1-8.

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.

Russo, S. J. & Nestler, E. J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature reviews neuroscience*, 14:609 – 625.

Sachs, B. & Barfield, R. (1976). Functional Analysis of Masculine Copulatory Behavior in the rat. *Advances in the study of behaviour*, 7: 91-154.

Sachs, B. & Mesei, R. (1988). The physiology of male sexual behavior. En Knobil, E. & Neil, J. (Editores). *The Physiology of Reproduction*, Raven Press, New York: pp. 1393 – 1482.

Scaletta, L. L. & Hull, E. M. (1990). Systemic or intracranial apomorphine increases copulation in long-term castrated male rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 37: 471–475.

Sesack, S. R. & Grace, A. A. (2010). Cortico-Basal Ganglia reward network: microcircuitry. *Neuropsychopharmacology*, 35: 27-47.

Sokolowski, K. & Corin, J. G. (2012). Wired for behaviors: from development to function of innate limbic system circuitry. *Frontiers in molecular neuroscience*, 5: 1 – 11.

Sugiura, T., Kishimoto, S., Oka, S. & Gokoh M. (2006). Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Progress in Lipid Research*, 45: 405–446.

Tagliamonte, A., Fratta, W. & Gessa, G. L. (1974). Aphrodisiac effect of L-Dopa and apomorphine in male sexually sluggish rats. *Experientia*, 30: 381–382

Tsutsumi, T., Kobayashi, T., Ueda, H., Yamauchi, E., Watanabe, S. & Okuyama, H. (1994). Lysophosphoinositide-specific phospholipase C in rat brain synaptic plasma membranes. *Neurochemical Research*, 19: 399 – 406.

Ueda, H., Kobayashi, T., Kishimoto, M., Tsutsumi, T. & Okuyama, H. (1993). A possible pathway of phosphoinositide metabolism through EDTA-insensitive phospholipase A1 followed by lysophosphoinositide-specific phospholipase C in rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 61:1874 – 1881.

Van Huijstee, A. N. & Mansvelder, H. D. (2015). Glutamatergic synaptic plasticity in the mesocorticolimbic system in addiction. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 466: 1 – 13.

Van Sickle, M., Ducancan, M., Kingsley, P., Mouihatel, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J., Marnett, L., Di Marzo, V., Pittman, Q., Patel, K. & Sharkey, K. (2005). Identification and Functional Characterization of Brainstem Cannabinoid CB2 Receptors. *Science*, 310: 329-332.

Van der Stelt, M. & Di Marzo, V. (2003). The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders. *European Journal of Pharmacology*, 480: 133 – 150.

Vinod, K. Y. & Hundung, B. L. (2005). Endocannabinoid lipids and mediated system: Implications for alcoholism and neuropsychiatric disorders. *Life Sciences* 77: 1569 – 1583.

Will, R. G., Hull E. M. & Dominguez, J. M. (2014). Influences of dopamine and glutamate in the medial preoptic area on male sexual behavior. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 121: 115–123.

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