



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

SEDE SUR

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

“Análisis del papel de receptores nicotínicos en el fenómeno de  
saciedad sexual”

TESIS

Que presenta

ANA EVELIA HERNÁNDEZ COLÍN

Para obtener el grado de  
MAESTRA EN CIENCIAS

Directora de la Tesis:

Dra. Gabriela Rodríguez Manzo

Ciudad de México

Julio 2022

Esta tesis se desarrolló en el laboratorio 18, a cargo de la Dra. Gabriela Rodríguez Manzo, tiempo durante el cual se recibió apoyo económico por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt), con número de becario 1007754, y por parte del CINVESTAV, durante el quinto semestre como apoyo extraordinario, a quienes se les agradece el importante apoyo otorgado.

Estoy sumamente agradecida con todas las investigadoras e investigadores del Departamento de Farmacobiología del CINVESTAV Sede Sur por su aporte y apoyo a la ciencia en México, especialmente con la Dra. Gabriela Rodríguez Manzo, brillante investigadora y un excelente ser humano, a quién considero un ejemplo a seguir. Quiero agradecer también a mi familia, en particular a mi madre y a mi padre, por su apoyo constante y su amor incondicional, así mismo, agradezco a mis compañeros, amigos y colegas por el tiempo y conocimiento compartido conmigo. Finalmente quiero agradecer a todos los animales cuyas vidas fueron, han sido y serán sacrificadas en el nombre de la ciencia, en búsqueda de un beneficio mayor para la humanidad.

**Dedicado a:**

Evelia Escamilla López

Jorge Colín Escamilla

Emelia Villa Olvera

Demetria Villa Olvera

## Índice

Agradecimientos generales .....	1
Agradecimientos personales .....	2
Dedicatoria .....	3
Resumen .....	5
Abstract .....	6
1. Introducción .....	7
1.1. Conductas motivadas .....	7
1.2. Conducta sexual de la rata macho.....	9
1.3. Fenómeno de saciedad sexual .....	9
1.4. Circuito mesolímbico dopaminérgico .....	10
1.5. Circuito mesolímbico y conducta sexual masculina .....	14
1.6. Sistema colinérgico y circuito mesolímbico.....	14
1.7. Receptores Nicotínicos de Acetilcolina (nAChR) .....	16
1.8. Actividad nAChR en circuito mesolímbico .....	18
1.9. nAChR y conducta sexual.....	21
2. Planteamiento del problema.....	22
3. Hipótesis.....	23
4. Objetivos generales.....	23
4.1. Objetivos particulares .....	23
5. Materiales y métodos .....	24
5.1. Animales .....	24
5.2. Paradigma de saciedad sexual .....	24
5.3. Prueba de actividad ambulatoria.....	25
5.4. Fármacos.....	26
6. Diseño experimental.....	27
7. Resultados .....	30
8. Discusión.....	39
9. Conclusiones.....	46
10. Perspectivas.....	47
11. Referencias.....	48
Anexo 1.....	64

## Resumen

El fenómeno de saciedad sexual consiste en una inhibición de la conducta sexual de larga duración que resulta de la cópula intensa. Diversas evidencias apuntan a la participación del circuito mesolímbico dopaminérgico (MSL) en este fenómeno. La cópula es una conducta recompensante que activa al MSL y la motivación sexual está regulada por el MSL. Antecedentes del laboratorio muestran que durante la inhibición sexual de ratas saciadas hay una disminución de las concentraciones de dopamina (DA) en el núcleo accumbens (NAcc). Evidencias sugieren que la acetilcolina (ACh) modula los niveles de DA en el NAcc y ambos neurotransmisores regulan la expresión de conductas motivadas en el MSL. En esta investigación se puso a prueba la hipótesis de que la cópula hasta la saciedad produce un aumento de la transmisión colinérgica en el NAcc que contribuye al establecimiento y mantenimiento de la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas a través de sus acciones sobre receptores nicotínicos (nAChR). Se exploró si el bloqueo de nAChR por la administración sistémica del antagonista mecamilamina durante la cópula hasta la saciedad interfería con el establecimiento de la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas y si revertía la inhibición sexual ya establecida a las 24 h post-saciedad. También se investigó si hay una interacción entre los sistemas DAérgico y colinérgico para la reversión de la saciedad sexual. Los resultados mostraron que la mecamilamina modula la conducta sexual de machos sexualmente expertos de forma dosis-dependiente, bloquea el establecimiento de la inhibición sexual de machos que copulan hasta la saciedad y revierte la inhibición sexual establecida. La reversión de la saciedad producida por mecamilamina se bloquea por un antagonista de receptores dopaminérgicos. Se concluye que durante la cópula hasta la saciedad hay liberación de ACh que contribuye al establecimiento de la inhibición sexual, a través de la activación de nAChR, que la ACh participa en el mantenimiento de la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas a través de activar nAChR y que los sistemas colinérgico y dopaminérgico parecen interactuar para la reversión de la inhibición sexual de ratas saciadas.

## Abstract

The sexual satiety phenomenon consists of a long-term sexual behavior inhibition resulting from intense copulation. Several studies suggest the involvement of the mesolimbic dopaminergic system (MSL) in this phenomenon. Copulation is a rewarding behavior that activates the MSL and the MSL regulates sexual motivation. Previous studies from our laboratory show that during the sexual inhibition of satiated rats, dopamine (DA) concentrations in the nucleus accumbens (NAcc) are diminished. There is also evidence showing that acetylcholine (ACh) modulates the level of DA in the NAcc and that both neurotransmitters regulate the expression of motivated behaviors in the MSL. The present study tested the hypothesis that copulation until satiety increases cholinergic neurotransmission at the NAcc that contributes to the establishment and maintenance of the sexual inhibition of sexually satiated rats, through nicotinic receptor (nAChR) activation. We tested if blockade of nAChR by the systemic administration of the antagonist mecamylamine during copulation to satiety would interfere with the establishment of the sexual inhibition and if it would reverse the established sexual inhibition 24 h after satiety. We also investigated if the dopaminergic and cholinergic systems interacted for sexual satiety reversal. Our results showed that mecamylamine regulates sexual behavior of sexually experienced male rats in a dose-dependent manner, interferes with the establishment of the sexual inhibition in male rats that copulated to satiety, and reversed the established sexual inhibition. The sexual satiety reversal produced by mecamylamine was blocked by a dopamine receptor antagonist. We conclude that during copulation to satiety there is ACh release that contributes to the establishment of the sexual inhibition of satiated rats through the activation of nAChR and participates as well in the maintenance of their sexual inhibitory state, also through nAChR activation, and that cholinergic and dopaminergic systems seem to interact for the reversal of the sexual inhibition in satiated rats.

## 1. Introducción

En este trabajo se analiza el papel del sistema colinérgico en la conducta sexual masculina de la rata, en particular, su interacción con el sistema mesolímbico dopaminérgico durante el fenómeno de saciedad sexual.

El circuito mesolímbico dopaminérgico, canónicamente conocido como el “circuito de la recompensa”, está formado por las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (ATV) que inervan áreas relacionadas con funciones ejecutivas, afectivas y motivacionales, incluidas la corteza prefrontal (CPF), la amígdala, el núcleo accumbens (NAcc) (Serafini et al., 2020) y el hipocampo (Barrot, 2014).

Se sabe que las conductas motivadas como la ingesta de comida, la cópula, la autodefensa y la conducta maternal son moduladas por el circuito mesolímbico (Volkow et al., 2017). Estas conductas son impulsadas por una experiencia previa con un reforzador positivo o negativo, lo que incrementa o disminuye la posibilidad de repetirlas (Palmiter, 2008; Parkes et al., 2015).

Cuando una rata macho alcanza la pubertad es capaz de desplegar conducta sexual de forma natural y, aunque se trata de un comportamiento innato, la conducta sexual es susceptible de modificarse por la experiencia (Pfaus et al., 2001, Rodríguez-Manzo & Canseco Alba, 2015). Las conductas que integran el patrón copulatorio de la rata macho pueden ser fácilmente reconocidas, cuantificadas y expresadas en términos de su frecuencia y latencia de aparición. Esto da lugar a parámetros específicos (numéricos y temporales) que se utilizan para evaluar experimentalmente la conducta sexual masculina (Sachs & Barfield, 1976; Larsson & Ahlenius, 1999; Hull & Rodríguez-Manzo, 2017).

### 1.1. Conductas motivadas

En neurociencias se utiliza con frecuencia terminología derivada de constructos psicológicos como emoción, cognición y motivación, que son útiles para describir, explicar e integrar conocimiento sobre las funciones de los circuitos neuronales (Salamone & Correa, 2018). A través de los años, el término “motivación” ha sido definido de maneras diferentes y discutido en múltiples contextos, el origen de este término se le

adjudica al filósofo Schopenhauer quien, tras considerar diferentes factores involucrados en la causa de la motivación, mencionó que “los organismos deben estar en posición de elegir, obtener y hasta buscar medios de satisfacción” (Schopenhauer, 1999). Más tarde Hull y Spence remarcaron la importancia de conceptos motivacionales como “drive” e “incentivo” para explicar aspectos de la conducta (Hull, 1943; Spence, 1956); Young, por su parte, definió motivación como “el proceso de estimular la acción, sosteniendo la actividad en progreso, y regulando el patrón de actividad” (Young, 1961). Más recientemente, Salamone definió motivación como el “conjunto de procesos a través de los cuales los organismos regulan la probabilidad, proximidad y disponibilidad de un estímulo” (Salamone, 1992). El constructo psicológico moderno de motivación hace referencia a los procesos conductualmente relevantes que permiten a los organismos regular tanto su entorno interno como externo y guiar la conducta hacia objetivos específicos (Salamone, 2010; Salamone & Correa, 2017a; Salamone & Correa, 2017b).

Un aspecto importante de la teoría e investigación sobre motivación es la idea de que existen tanto aspectos “direccionales” como “activacionales”. Cofer menciona que estos aspectos tienen al menos dos funciones: la primera es energizar respuestas y controlar su vigor y eficiencia; la segunda es guiar la conducta hacia un fin específico (Cofer, 1972). Uno de los factores más importantes de las conductas motivadas es que son “dirigidas” hacia un objetivo, factor llamado también, aspecto direccional de la motivación (Salamone, 1992; Salamone, 2010). Los organismos “buscan” algunos estímulos (p.ej: comida) y evitan o escapan, de otros (p.ej: dolor); los patrones de conducta involucrados pueden ser activos (p.ej.: forrajeo de alimento) o pasivos (p. ej.: conducta de congelamiento o “freezing”).

Al final del despliegue de la conducta existe un contacto directo con el objetivo-estímulo, conocido canónicamente como la fase “consumatoria”. La única manera de entrar en contacto con el objetivo-estímulo es desplegar un patrón de conductas que acerque al organismo a su meta; esta fase de la motivación se conoce como “preparatoria” o “instrumental” (Craig, 1918; Salamone, 1991; Salamone, 1992).

La representación neuronal de funciones conductuales es complicada e intentar asociarlas, con precisión, a sistemas neuronales distintos a aquellos asociados a las

funciones emocionales es problemático, ya que los procesos motivacionales están interconectados con los procesos emocionales y de reforzamiento (Salamone, 2010; Salamone & Correa, 2017a; Salamone & Correa, 2017b). Berridge y colaboradores hicieron una importante distinción entre estos sistemas definiendo la diferencia entre “liking” (reacción hedónica) y “wanting” (motivación incentiva: propensión a perseguir un estímulo) (Berridge & Robinson, 1998; Berridge & Kringelbach, 2015). Otro concepto importante, es el de “reforzador”; un reforzador positivo ocurre cuando a la respuesta conductual le sigue un estímulo positivo que aumenta la probabilidad de que dicha respuesta se repita (Skinner, 1953) y, en este proceso, existe un componente de aprendizaje asociativo (Colwill & Rescorla, 1986). Los sistemas neuronales que regulan las señales de salida motoras parecen operar bajo el mando de los sistemas que regulan la motivación (Salamone, 2010; Salamone & Correa, 2017a; Salamone & Correa, 2017b).

### **1.2. Conducta sexual de la rata macho**

La conducta sexual de la rata macho es una conducta determinada genéticamente y que tiene un carácter estereotipado que consiste en un patrón complejo de respuestas genitales y sensoriomotoras integradas. El patrón copulatorio de la rata macho está compuesto de respuestas de monta y de monta con intromisión, que culminan con la eyaculación. Ésta es seguida de un periodo de refractariedad a la estimulación sexual, el intervalo post-eyaculatorio, que tiene una duración de 4 a 5 min después de la primera eyaculación y se prolonga de 1 a 2 minutos más, con cada eyaculación sucesiva. A la serie de eventos conductuales que se presentan desde la primera intromisión hasta la eyaculación se le denomina serie eyaculatoria, cuando se incluye al intervalo post-eyaculatorio (IPE) en la serie, se le denomina serie copulatoria (Hull & Rodríguez-Manzo, 2017).

### **1.3. Fenómeno de saciedad sexual**

Se ha determinado previamente que, si se permite a ratas macho copular libremente con una misma hembra receptiva, éstas presentarán eyaculaciones sucesivas hasta alcanzar la saciedad sexual. En este periodo de cópula *ad libitum* las ratas macho presentan diferencias en su capacidad eyaculatoria individual, por lo que las ratas macho son

capaces de realizar entre cinco y doce series eyaculatorias sucesivas (con un promedio de siete series). El criterio para considerar que una rata ha alcanzado la saciedad es que transcurran 90 min desde la última eyaculación, sin que el macho vuelva a eyacular. Este criterio lo alcanzan todas las ratas macho en un período de 4 h, independientemente la capacidad eyaculatoria individual (Rodríguez-Manzo et al., 2011). Veinticuatro horas después de la cópula hasta la saciedad, las ratas macho están sexualmente inhibidas. Esta inhibición sexual se expresa de dos maneras distintas, ya sea por la ausencia total de conducta sexual en presencia de una hembra sexualmente receptiva, lo que se presenta en la mayoría de los sujetos (dos tercios de la población) o por la ejecución de una sola serie eyaculatoria, después de la cual los machos no reinician la cópula, y que se presenta en el tercio restante de la población (Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1994). Este estado inhibitorio se mantiene por aproximadamente 72 horas, pero se requieren hasta 15 días de inactividad sexual para que los animales recuperen su capacidad eyaculatoria inicial (Rodríguez-Manzo et al., 2011).

#### **1.4. Circuito mesolímbico dopaminérgico**

El circuito dopaminérgico ATV-NAcc es conocido por su papel en la regulación de conductas motivadas y en el procesamiento de eventos recompensantes y aversivos (Ghosal et al., 2019; Pignatelli, 2015). El ATV es una estructura heterogénea compuesta predominantemente por neuronas dopaminérgicas (55%-65%), así como por neuronas GABAérgicas (30%) y una pequeña porción de neuronas glutamatérgicas (5%) (Steffensen et al., 1998; Hnasko et al., 2012; Zaborsky, 2002). En roedores, las neuronas dopaminérgicas del ATV se encuentran dispersas en varias subregiones, incluidos el núcleo pigmentado parabraquial (PBP), el núcleo paranigral (PN), el núcleo caudado lineal (CLi), el núcleo interfascicular (IF) y el núcleo rostral lineal del rafé (RLi) (Beier et al., 2015).

Estudios electrofisiológicos han mostrado que las neuronas dopaminérgicas (DAérgicas) del circuito mesolímbico disparan de dos formas distintas: disparo en espigas simples o disparo en ráfaga, lo que tiene un impacto en el patrón de liberación de dopamina en el NAcc. El disparo en espigas simples está asociado a la liberación tónica de DA (5-10 nM) y es resultado de la actividad intrínseca, tipo marcapaso (similar al del músculo cardíaco)

de estas neuronas, mientras que el disparo en ráfaga, que depende de la liberación de glutamato en el ATV, promueve la liberación de una gran cantidad de DA (150-400 nM) en el NAcc (Grace, 1991; Grace et al., 2007), lo que se considera un componente clave de la señalización inducida por estímulos recompensantes (Wise, 2004).

Las neuronas DAérgicas son capaces de codificar tres diferentes tipos de recompensa: a) recompensa “esperada”, que produce actividad basal, b) recompensa “mejor que la esperada”, que provoca el disparo en ráfaga y c) recompensa “peor de la esperada” que produce una pausa momentánea en la actividad neuronal (Pignatelli & Bonci, 2015).

La actividad de las neuronas DAérgicas del circuito mesolímbico está regulada en el ATV tanto por aferentes glutamatérgicas, que participan en la inducción del disparo en ráfaga (Paladini & Roeper, 2014), como por aferentes GABAérgicas, que inhiben la actividad de las neuronas DAérgicas de forma tónica, a través de la activación de receptores GABA<sub>A</sub>, lo que las mantiene en su actividad basal. La estimulación optogenética de estos receptores facilita la aversión de lugar condicionada e interrumpe el consumo de recompensas (Tan et al., 2012; van Zessen et al., 2012).

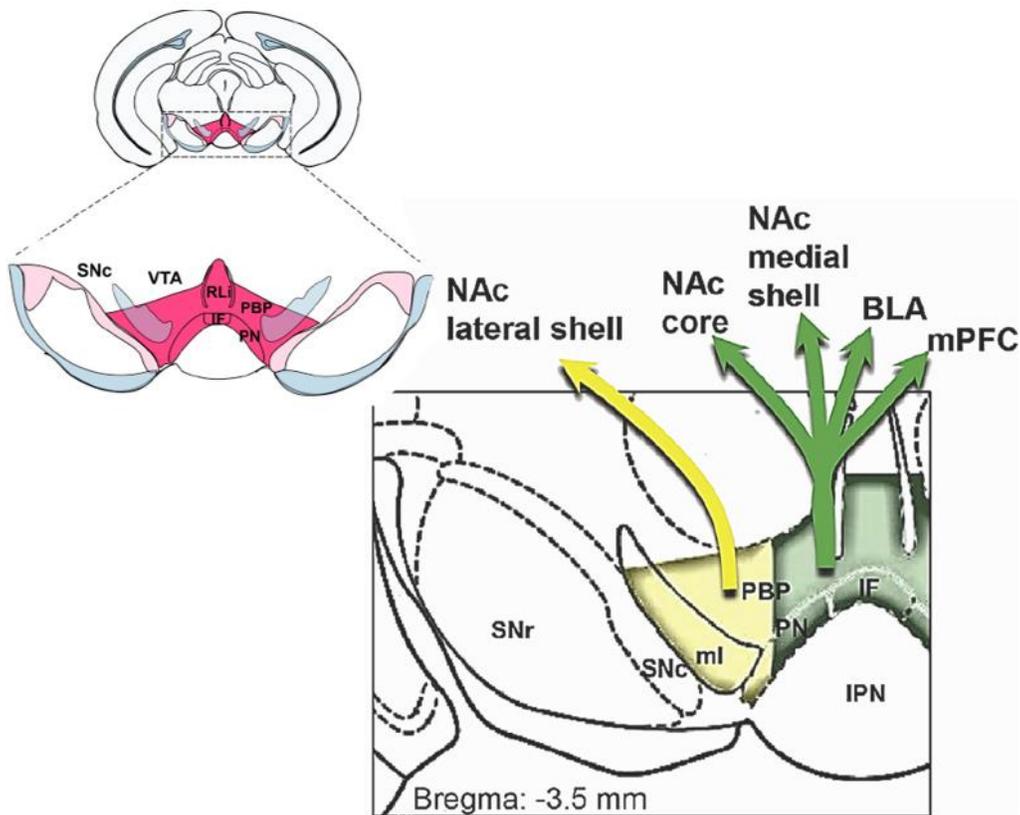
Al ATV llegan también aferentes colinérgicas provenientes del núcleo tegmental pedúnculo pontino (PPT) y del tegmento pontino laterodorsal (LDT) (Mesulam et al., 1983). La acetilcolina (ACh) liberada, actúa a través de receptores colinérgicos nicóticos (nAChR) y muscarínicos (mAChR) y participa en la modulación de la función del ATV (Fagen et al., 2003). Los nAChR en el ATV están localizados en las terminales glutamatérgicas, en los somas de las neuronas dopaminérgicas (Pidoplichko et al., 1997) y en los somas de interneuronas GABAérgicas (Yin & French, 2000). La localización de los receptores muscarínicos en esta región es menos clara. La inactivación de las aferencias colinérgicas que llegan al ATV disminuye la motivación para autoadministrarse estímulos recompensantes naturales o drogas de abuso (Rada et al., 2000).

El NAcc forma parte del cuerpo estriado (estriado ventral), junto con los núcleos caudado y putamen (estriado dorsal) (Gefen & Surmeier, 2011). Se conocen cinco tipos celulares discernibles en el estriado: dos poblaciones neuronales que envían proyecciones a otras regiones del cerebro y tres poblaciones de interneuronas. Las

primeras se describen como neuronas espinosas medias (MSN), llamadas así por el tamaño medio de su soma (~14  $\mu\text{m}$  de diámetro) y la alta densidad de espinas en sus árboles dendríticos. Las MSN son de naturaleza GABAérgica y representan entre el 90 % y 95 % de todas las neuronas en el estriado. Los registros electrofisiológicos indican que las MSN presentan una tasa de disparo extremadamente baja (~1 Hz), lo que sugiere que existe una liberación tónica de GABA, además de que expresan un número elevado de canales de fuga de potasio, lo que favorece la hiperpolarización de su membrana. Las MSN se subdividen en aquéllas que forman parte de la ruta directa y las que forman parte de la ruta indirecta (Heimer et al., 2008).

Las MSN de cada una de estas rutas muestran una expresión diferencial de receptores y neuropéptidos que sirven como marcadores para identificarlas. Las MSN de la ruta directa expresan receptores dopaminérgicos tipo D1, dinorfina y sustancia P; en contraste, las MSN de la ruta indirecta expresan receptores dopaminérgicos tipo D2, receptores de adenosina 2A y encefalinas. Las MSN de la ruta directa inervan a la sustancia nigra (SN) y al ATV, mientras que las MSN de la ruta indirecta inervan estructuras como el pálido ventral y el hipotálamo, donde hacen un relevo para posteriormente inervar al ATV y a la SN. El 5% restante de las neuronas en el estriado son poblaciones de interneuronas que incluyen: (1) interneuronas GABAérgicas de espigas rápidas (FSI) y liberadoras de parvalbúmina (PV), (2) interneuronas GABAérgicas de umbral bajo persistente y liberadoras de somatostatina (SOM), neuropéptido Y (NPY) y óxido nítrico (ON) e (3) interneuronas colinérgicas (CIN). Las CIN tienen un soma de ~20-30  $\mu\text{m}$  de diámetro y su arborización se extiende hasta por ~1 mm, lo que les permite coordinar la actividad de vastas franjas de tejido estriatal. Estas interneuronas están tónicamente activas, presentan una tasa de disparo elevada (5 Hz), y codifican la información saliente mediante pausas transitorias en su actividad (Castro & Bruchas, 2019). Las CIN modulan la actividad de las MSN interviniendo en la regulación de la liberación local de DA de las terminales DAérgicas en el NAcc (Collins et al., 2019) o en coordinación con otros grupos de interneuronas GABAérgicas (Cachope et al., 2012). Por otro lado, la actividad de las CIN puede sincronizarse por la señalización DAérgica en ráfaga del ATV (Mingote et al., 2019).

El NAcc es considerado el mayor regulador de las conductas motivadas (Serafini et al., 2020) y tiene una división anatómica que es funcionalmente importante: la zona central (core), la corteza medial (medial shell) y la corteza lateral (lateral shell) (Heimer, et. al 2008). El NAcc shell medial recibe inervación dopaminérgica de las subdivisiones posteromediales del ATV (que incluyen el IF, CLi y PN), mientras que el NAcc shell lateral y el NAcc core reciben inervación DAérgica de la mitad lateral del ATV (que incluye el PBP) (Beier et al., 2015). Existe una subpoblación de neuronas DAérgicas del ATV, que se distingue por co-liberar glutamato, que proyecta sus axones preferencialmente al NAcc shell medial (Mingote et al., 2019).



*En el esquema, se muestran las proyecciones dopaminérgicas a la corteza prefrontal medial (mPFC), amígdala basolateral (BLA), núcleo accumbens (NAcc) core, y NAcc shell medial que surgen principalmente del ATV medial (IF, PN medial y PBP medial; verde). Las proyecciones dopaminérgicas al NAcc shell lateral surgen del ATV lateral (PBP lateral; amarillo) (modificado de Lammel et al., 2014; Mingote et. al.2019).*

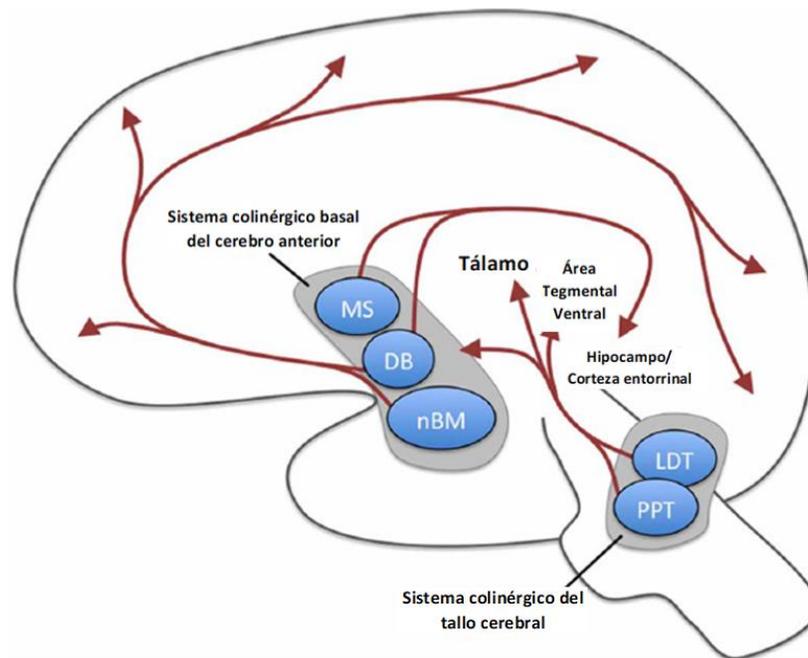
### **1.5. Circuito mesolímbico y conducta sexual masculina**

El circuito mesolímbico (MLS) participa en el control del componente motivacional de la conducta sexual de la rata macho (Everitt, 1990; Giuliano & Allard, 2001; Guadarrama-Bazante & Rodríguez-Manzo, 2019), y a su vez es activado por la cópula (Balfour et al., 2004). La activación del MLS por la cópula cambia el patrón de disparo de las neuronas DAérgicas al modo de ráfaga (Bromberg-Martin et al., 2010), lo que está asociado al incremento en la liberación de DA en el NAcc (Mas et al., 1990; Pfaus et al., 1990). Durante todo el proceso de cópula hasta la saciedad, los niveles de DA en el NAcc se mantienen elevados (Fiorino et al., 1997; Canseco-Alba, 2016).

Datos de nuestro laboratorio muestran que a las 24 h post-saciedad, cuando los machos están sexualmente inhibidos, los niveles basales de DA del NAcc están disminuidos y, al exponer a los animales saciados en ese momento a una hembra sexualmente receptiva, se produce una caída adicional en los niveles extracelulares de DA y sus metabolitos (Canseco-Alba, 2016).

### **1.6. Sistema colinérgico y circuito mesolímbico**

La acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor presente tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en el sistema nervioso periférico. Se sintetiza por la colinacetiltransferasa, a partir de la colina y la acetil-CoA, y se metaboliza por acción de la acetilcolinesterasa, obteniendo colina y acetato como metabolitos (Tyagi et al., 2019). Las neuronas colinérgicas en el sistema nervioso central se concentran en dos grupos: 1) el sistema colinérgico magnocelular basal del cerebro anterior y 2) el sistema colinérgico del tallo cerebral. El primero incluye al núcleo septal medial (MS), a los brazos vertical y horizontal de la banda diagonal de Broca (DB), y al núcleo basal magnocelular (nBM). El segundo incluye al núcleo tegmental pedúnculo pontino (PPT) y al tegmento pontino laterodorsal (LDT) (Mesulam et al., 1983).



*En el esquema se muestran las principales vías colinérgicas del sistema nervioso central y los núcleos en los que se originan. MS: núcleo septal medial; DB: brazos vertical y horizontal de la banda diagonal de Broca; nBM: núcleo basal magnocelular; PPT: núcleo tegmental pedúnculo pontino; LDT: tegmento pontino laterodorsal (modificado de Newman et al., 2012).*

La transmisión colinérgica en el MSL está presente tanto en el ATV como en el NAcc. El ATV recibe proyecciones colinérgicas del PPT y del LDT (Mesulam et al., 1983) y en el NAcc hay una población de interneuronas colinérgicas (CIN), tónicamente activas, que regulan tanto la actividad de las MSN, como la de las interneuronas GABAérgicas (Cachope et al., 2012) y modulan localmente la liberación de DA de las terminales DAérgicas (Collins et al., 2019).

Las acciones de la ACh se llevan a cabo a través de receptores pre- y postsinápticos. Se conocen dos familias de receptores colinérgicos: los receptores metabotrópicos muscarínicos (mAChR) y los receptores ionotrópicos nicotínicos (nAChR) (Picciotto et al., 2000; Nolan et al., 2020). Los mAChR están acoplados a proteínas Gq (M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> y M<sub>5</sub>) o a proteínas Gi (M<sub>2</sub> y M<sub>4</sub>), según el subtipo (Wess, 2003). Los nAChR funcionan como canales no-selectivos de cationes excitatorios (Changeux, et Al., 1998) y el tipo de señalización a través de ellos depende del subtipo y de su localización (Picciotto et al., 2012).

## 1.7. Receptores Nicotínicos de Acetilcolina (nAChR)

Los nAChR son canales de cationes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ), pentaméricos, dependientes de ligando, compuestos de subunidades homólogas, genéticamente distintas. La función de los nAChR depende de la combinación de las subunidades que los componen, que para los nAChR neuronales, pueden ser cualquiera de las 9 subunidades alfa ( $\alpha_2$ - $\alpha_{10}$ ) y de las 3 subunidades beta ( $\beta_2$ - $\beta_4$ ) que se conocen hasta el momento. Cada receptor se compone de 5 de estas subunidades, típicamente en composición heteromérica, aunque los arreglos homoméricos  $\alpha_7$  también existen (Karlin, 1993; Karlin, 2002). Las diferentes asociaciones entre subunidades confieren a cada subtipo de nAChR propiedades estructurales y funcionales distintas (Nai, Q et al., 2003). Se pueden dividir en dos grupos amplios: los que contienen la subunidad  $\alpha_6$  y los que no la contienen; esta subunidad no está presente en los nAChR del sistema nervioso periférico (Champtiaux et. al. 2002; Salminen et al., 2004). Se ha establecido que las subunidades que componen a un nAChR influyen en su permeabilidad intrínseca al calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ); los nAChR neuronales heteroméricos que contienen subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  tienen una corriente fraccional de  $\text{Ca}^{2+}$  de 2-5 %, mientras que las composiciones homoméricas  $\alpha_7$  (nAChR- $\alpha_7$ ) presentan la corriente fraccional de  $\text{Ca}^{2+}$  más alta, de entre 6 y 12 % (Fucile, 2004).

Los receptores nicotínicos al ser activados producen corrientes entrantes de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) a través del poro del canal y la despolarización producida por su activación puede activar también a los canales de calcio dependientes de voltaje (VOCCs), aumentando aún más la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  generada por los nAChR (Rathouz & Berg, 1994). Además, la activación de nAChR puede liberar  $\text{Ca}^{2+}$  de depósitos intracelulares, contribuyendo a la señalización de larga duración mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  (Dajas-Bailador et al., 2002).

Una proporción importante de nAChR en el CNS se expresa en las terminales presinápticas, y su activación facilita la liberación del neurotransmisor dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Role & Berg, 1996; Wonnacott, 1997) a través de activar la exocitosis, promovida ya sea por la apertura de los VOCCs en respuesta a la despolarización o en respuesta al ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del canal del nAChR (Dani, 2001; Dajas-Bailador & Wonnacott, 2004; Dani & Bertrand, 2007). Los nAChR presinápticos también pueden modular la liberación de neurotransmisor a través de otros mecanismos celulares



desensibilización se observa funcionalmente como una reducción relativa de receptores activables (Katz & Thesleff, 1957). La diferencia en los estados funcionales depende principalmente de los cambios conformacionales que se dan en la interfaz de las subunidades de los nAChR; la desensibilización rápida se acompaña de cambios en la interfaz de las subunidades  $\alpha$ - $\gamma$ , mientras que la desensibilización lenta va de la mano de cambios en la interfaz de las subunidades  $\alpha$ - $\delta$  (Yamodo et al., 2010).

En el caso de los nAChR neuronales que tienen una alta afinidad por nicotina ( $\alpha_4\beta_2$ ), se estima que el 60% se encuentra en estado D (Lipiello et al., 1987) y, por el contrario, menos del 1% de los nAChR- $\alpha_7$  se encuentran en estado D (Corringer et al., 1998). Dado que los estados D presentan mayor afinidad por nicotina, con el paso del tiempo, en presencia constante del agonista todos los nAChR terminarían desensibilizados (Quick & Lester, 2002). Los nAChR- $\alpha_4\beta_2$  se desensibilizan a concentraciones de  $IC_{50} \sim 1-60$  nM de nicotina (Lipiello et al. 1987; Wonnacott, 1987; Quick & Lester, 2002), mientras las requeridas para desensibilizar a los nAChR- $\alpha_7$  son de  $IC_{50} \sim 0.5-7$   $\mu$ M (Fenster et al., 1997; Quick & Lester, 2002).

### **1.8. Actividad nAChR en circuito mesolímbico**

En el ATV, la principal fuente de ACh proviene de las proyecciones colinérgicas del PPT y del LDT (Mesulam et al., 1983). En esta región, los nAChR que contienen subunidades  $\beta_2$  y presentan una rápida desensibilización después de su activación, están asociados a neuronas GABAérgicas y somas de neuronas DAérgicas, mientras que los nAChR- $\alpha_7$  (Gueorguiev, et al., 2000), que muestran un menor grado de desensibilización, están asociados principalmente a las terminales glutamatérgicas (Laviolette & van der Kooy, 2004; Faure et al., 2014). La activación de nAChR somatodendríticos en las neuronas DAérgicas del ATV las estimula directamente y genera respuestas transitorias que se terminan por la desensibilización de los nAChR (Pidoplichko et al., 1997). Por otro lado, la activación y posterior desensibilización de los nAChR presentes en las neuronas GABAérgicas del ATV contribuye a la estimulación de las neuronas DAérgicas al eliminar la influencia inhibitoria de GABA (Laviolette & van der Kooy, 2004). Finalmente, los nAChR- $\alpha_7$  asociados a las terminales glutamatérgicas pueden facilitar la liberación de

glutamato, que contribuye a inducir el disparo en ráfaga en las neuronas DAérgicas a través de activar receptores NMDA (Floresco et al., 2003; Pidoplichko et al., 2004).

En el NAcc las CIN son la fuente primaria de ACh (Zhou et al., 2002) y se ha demostrado que pueden regular localmente la liberación de DA (Cachope & Cheer, 2014; Cragg, 2006; Picciotto et al., 2012). La actividad autónoma de las CINs, tipo marcapasos, les permite disparar pequeños potenciales de acción (2-10 Hz) en ausencia de actividad sináptica, por ello se refiere a ellas como tónicamente activas (Aosaki et al., 2010). Aunque representan solo entre el 1 y 3 % del total de las neuronas en el estriado, tienen una gran arborización axonal (Bolam, 1984), distribuida ampliamente por la matriz, y su blanco principal son las MSNs (Graybiel, 1984). La regulación colinérgica de las MSN está mediada principalmente por receptores muscarínicos de tipo M1 (Oldenburg & Ding, 2011; Wang et al., 2006).

Los nAChR más comúnmente expresados en el NAcc contienen las subunidades  $\alpha_4$ ,  $\alpha_6$ ,  $\alpha_7$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  (Quirk et al., 2007) y se localizan en las CIN, en las terminales glutamatérgicas y DAérgicas, así como en los somas de interneuronas GABAérgicas (Azam et al., 2003; Marchi et al., 2002; Liss & Roeper, 2010; de Rover et al., 2002; Lim et al., 2012). Se considera que todos los nAChR de las terminales DAérgicas del estriado contienen la subunidad  $\beta_2$  (Picciotto et al., 1998; Fennell et al., 2019; Siciliano et al., 2017).

Las terminales de las neuronas DAérgicas del ATV hacen sinapsis con las MSN y con las CIN en el NAcc (Smith & Bolam, 1990). La DA regula múltiples conductancias intrínsecas en las CINs, modulando la actividad de los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje sobre su membrana (Maurice et al., 2004; Deng et al., 2007). Una vez que las CIN son activadas por el glutamato liberado de aferencias glutamatérgicas (Bolam, 1984), éstas en seguida pausan su actividad, y esta pausa es mediada por la activación de receptores D2 (Straub et al., 2014; Lim et al., 2014). Dada la extensa arborización de las CIN, pueden modular de forma simultánea la actividad de un gran número de neuronas en el NAcc (Lee et al., 2020).

La ACh puede activar nAChR localizados en interneuronas GABAérgicas del NAcc, induciendo la liberación de GABA, que activa a los receptores  $\text{GABA}_A$  en las MSN, inhibiendo su actividad, lo que da por resultado la desinhibición en sus áreas de

proyección (Di Chiara et al., 1994; de Rover et al., 2002; Mingote et al., 2019; Brimblecombe et al., 2018). Un solo potencial de acción en una CIN da por resultado un decremento del 25 % en la corriente postsináptica excitatoria (EPSC) en un tercio de las MSN vecinas (Pakhotin & Bracci, 2007). Por otro lado, la activación optogenética de CINs incrementa la frecuencia de eventos sinápticos GABAérgicos en MSN vecinas (Witten et al., 2010), lo que sugiere la participación del sistema colinérgico en la regulación de las señales inhibitorias en el NAcc.

La ACh tiene además un papel particular en la regulación de la expresión de conductas motivadas, a través de modular la liberación de DA de las terminales sinápticas en el NAcc, por la activación de nAChR presinápticos (Collins et al., 2016; Exley & Cragg, 2008; Zhou et al., 2001). Esta regulación depende del nivel de actividad de las neuronas DAérgicas (Zhang et al., 2009; Zhang & Sulzer, 2004); cuando los nAChR están inactivos o desensibilizados, la liberación fásica de DA se potencia, especialmente frente al disparo en ráfaga de la neurona DAérgica (Zhang & Sulzer, 2004). La activación de los nAChR presinápticos que contienen la subunidad  $\beta 2$  facilita la liberación tónica de DA (Lim et al., 2014), pero suprime la liberación de DA que resulta de una estimulación de alta frecuencia, similar al disparo en ráfaga (Exley & Cragg, 2008; Threlfell & Cragg, 2011; Rice & Cragg, 2004; Picciotto et al., 2012).

La estimulación eléctrica de terminales dopaminérgicas en el NAcc no modifica por sí misma la cantidad de DA liberada, sin embargo, en presencia de un antagonista de nAChR se produce un aumento importante en la DA que se libera ante el mismo estímulo eléctrico (Rice & Cragg, 2004; Zhang & Sulzer, 2004), lo que sugiere que activación de nAChR modula la cantidad de DA que es liberada de las terminales sinápticas (Threlfell et al., 2012).

La inyección subcutánea del antagonista no-selectivo y no-competitivo del nAChR, mecamilamina (1 mg/kg), bloquea el incremento de DA en NAcc ocasionado por nicotina administrada localmente (Mifsud et al., 1989), lo que sugiere que la nicotina produce liberación de DA a través de la activación local de nAChR (Mansvelder & McGehee, 2002). La nicotina incrementa selectivamente la cantidad de DA liberada por el disparo en ráfaga de las neuronas DAérgicas (Rice & Cragg, 2004). Está bien establecido que

los estímulos recompensantes desencadenan el disparo en ráfaga de neuronas DAérgicas (Schultz, 2001), por lo que es posible que el bloqueo de nAChR- $\beta$ 2 aumente la DA liberada en respuesta a una recompensa predecible.

La ACh juega un papel importante en la regulación de la actividad del circuito mesolímbico (Rice & Craigg, 2004). Las conductas que son reforzadas positivamente producen un aumento de ACh de magnitud intermedia en el NAcc, mientras que el aumento grande y sostenido de ACh en el NAcc se ha asociado a estímulos aversivos o a señales que inhiben las conductas apetitivas, como la saciedad por comida (Mark et al., 1995; Mark et al., 2011; Hoebel et al., 2007). Los estímulos que desalientan las conductas motivadas activan a las interneuronas colinérgicas, es decir, las CIN estriatales incrementan su actividad cuando una conducta motivada es desalentada (Nougaret & Ravel, 2015; Lee, 2006), por ejemplo durante los estados de saciedad a comida (Mark et al., 1992), mientras que los estímulos que predicen una recompensa y promueven las conductas motivadas producen una pausa en la actividad de las CIN (Aosaki, et al., 1994; Morris, et al., 2004; Joshua, et al., 2008; Nougaret & Ravel, 2015).

Los cambios en la transmisión DAérgica en el NAcc shell modulan el grado en que repertorios conductuales interfieren con la conducta en marcha; es decir, el aumento en la transmisión DAérgica se asocia con la posibilidad de cambiar a una nueva estrategia conductual (behavioral switching), mientras que la transmisión DAérgica reducida disminuye la posibilidad de cambio (Mingote et al., 2019). Es posible que la modulación del proceso de extinción de una conducta esté ligado a la intercomunicación de neuronas DAérgicas y de CINs, que pueden proveer el medio por el cual cambios lentos en los niveles basales de DA puedan controlar su liberación fásica ante ciertos estímulos sensoriales y determinar la influencia de un estímulo reforzante (Schulz & Reynolds, 2013).

### **1.9. nAChR y conducta sexual**

La literatura referente al papel de los nAChR en la regulación de la conducta sexual es escasa (Floody, 2014). Previamente había sido reportado que dosis relativamente bajas de nicotina producen un efecto facilitador de la conducta sexual masculina en ratas,

incrementando el número de eyaculaciones y disminuyendo el de intromisiones, así como la duración de la latencia de eyaculación y del intervalo posteyaculatorio (Soulairac & Soulairac, 1975). Evidencia distinta reporta que dosis altas de nicotina disminuyen el número de intromisiones, mientras que dosis bajas carecen de efecto (Retana-Marquez et al., 1993). Estos resultados evidencian que el sistema colinérgico participa en la regulación de la conducta sexual masculina de la rata a través de activar receptores nicotínicos, pero no proporcionan información clara acerca del papel que juegan estos receptores en dicha regulación.

## **2. Planteamiento del problema**

A las 24 h que siguen a la cópula hasta la saciedad, las ratas sexualmente exhaustas no presentan conducta sexual en presencia de una hembra receptiva, lo que resulta sorprendente pues se trata de una conducta instintiva. El MSL DAérgico está involucrado en la regulación de las conductas motivadas como la conducta sexual y se considera que la DA en el NAcc juega un papel clave para traducir la motivación en acción (Mogenson et al., 1980). Se ha demostrado que, durante el período de inhibición sexual, las ratas sexualmente saciadas tienen una motivación sexual disminuida (Guadarrama-Bazante & Rodríguez-Manzo, 2019; Canseco-Alba & Rodríguez-Manzo, 2019) y niveles basales de DA reducidos en el NAcc, que disminuyen aún más cuando estas ratas son expuestas a hembras sexualmente receptivas a las 24 h post-saciedad (Canseco-Alba, 2016).

En conjunto, estos datos sugieren que la disminución en la motivación sexual de los machos sexualmente saciados podría ser secundaria a una caída en los niveles de DA en el NAcc. Sin embargo, no se sabe qué mecanismos están involucrados en la disminución de los niveles de DA en el NAcc de las ratas sexualmente saciadas.

La ACh es un neurotransmisor presente en el circuito mesolímbico (Hoebel et al., 2007), donde su función ha sido poco explorada. Numerosas evidencias sugieren que la DA y la ACh podrían tener un papel combinado en el MSL en la modulación de conductas motivadas (Damsa et al., 1990; de Boer et al., 1992; Stadler et al., 1973; Stoof et al., 1982; Tedford et al., 1992). Niveles elevados de ACh en el NAcc se han asociado a la saciedad por comida y a estados aversivos condicionados (Mark et al., 1995). Por otro

lado, se sabe que las CIN pueden modular la actividad de las MSN en el NAcc (Di Chiara et al., 1994; de Rover et al., 2002) y se ha demostrado que la activación de receptores nicotínicos en esta región cerebral aumenta los niveles extracelulares de DA (Mark et al., 2011).

Con base en estos datos nos planteamos la hipótesis de que la cópula hasta la saciedad podría producir un aumento en los niveles de ACh en el MSL, que induzca un estado aversivo y/o produzca una disminución en los niveles basales de DA en el NAcc, que podría estar asociada a la falta de respuesta de los machos sexualmente exhaustos frente una hembra sexualmente receptiva. Por ello, resulta interesante determinar la posible participación de la ACh del circuito mesolímbico en la inhibición sexual que caracteriza a las ratas sexualmente saciadas.

### **3. Hipótesis**

La cópula hasta la saciedad produce un aumento de la transmisión colinérgica en el NAcc que contribuye al establecimiento y mantenimiento de la inhibición sexual de ratas sexualmente exhaustas, a través de sus acciones sobre receptores nicotínicos.

### **4. Objetivos generales**

1. Determinar si el bloqueo de receptores nicotínicos durante la cópula hasta la saciedad interfiere con el establecimiento de la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas.
2. Establecer si el bloqueo de receptores nicotínicos a las 24 h post-saciedad, revierte la inhibición sexual ya establecida, y si hay una interacción entre los sistemas DAérgico y colinérgico en dicho efecto.

#### **4.1. Objetivos particulares**

1. Determinar si el bloqueo de receptores nicotínicos durante la cópula hasta la saciedad previene el establecimiento de la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas.
2. Determinar si el bloqueo de receptores nicotínicos a las 24 h post-saciedad revierte la inhibición sexual establecida en las ratas sexualmente saciadas.

3. Determinar si hay una interacción entre los sistemas colinérgico y dopaminérgico para la reversión de la inhibición sexual a las 24 h post-saciedad.

## **5. Materiales y métodos**

### **5.1. Animales**

Se usaron ratas macho de la cepa Wistar (con un peso de 250-300 g) sexualmente expertas, como sujetos de experimentación y ratas hembra Wistar adultas, sexualmente receptivas, como estímulo para las pruebas de conducta sexual. La receptividad sexual se indujo por la administración secuencial de benzoato de estradiol (12 µg/rata, s.c.) seguida, 19 h más tarde, de progesterona (6 mg/rata, s.c.). La receptividad sexual se presenta 4 h después de la administración de progesterona. Los machos fueron sometidos a 3-5 sesiones de cópula para que adquirieran experiencia sexual y aquéllos que presentaron latencias de eyaculación menores a 15 min, en al menos 3 sesiones, se consideraron sexualmente expertos y se seleccionaron para los experimentos. Todos los animales permanecieron en un cuarto con un ciclo de luz/obscuridad invertido (12 h/12 h, la luz se apaga a las 22:00 h) y con temperatura controlada. Se alojaron ocho animales por caja, con libre acceso a agua y alimento.

### **5.2. Paradigma de saciedad sexual**

A ratas macho sexualmente expertas se les permitió copular *ad libitum* con una misma hembra receptiva durante aproximadamente 4 h, periodo suficiente para que todos los sujetos alcanzaran el criterio de saciedad (90 min desde la última eyaculación, sin que vuelvan a eyacular) (Rodríguez-Manzo et al., 2011). Veinticuatro horas más tarde, las ratas saciadas fueron sometidas a un nuevo registro de conducta sexual, previa administración del tratamiento farmacológico. Esta prueba finalizó después de la ejecución de 2 series eyaculatorias o cuando transcurrieron 30 min 1) sin que la rata presente una intromisión, 2) después de una intromisión, sin que alcance la eyaculación o 3) después de la eyaculación, sin que el animal reinicie la cópula.

### **5.3. Prueba de actividad ambulatoria**

Se registró la actividad ambulatoria espontánea de los animales que recibieron tratamientos farmacológicos para descartar posibles alteraciones motoras producidas por los tratamientos que pudieran interferir con la ejecución de la conducta sexual. El registro se realizó al finalizar la prueba de conducta sexual.

La actividad ambulatoria se registró en una caja de acrílico (33 x 44 x 20 cm) que tiene la base cuadriculada, dividida en 12 cuadros (12 x 12 cm c/u). Se colocó individualmente a las ratas y se contabilizó cuantas veces cruzaban de un cuadro a otro durante 5 min. La caja se limpió entre pruebas para eliminar olores.

## 5.4. Fármacos

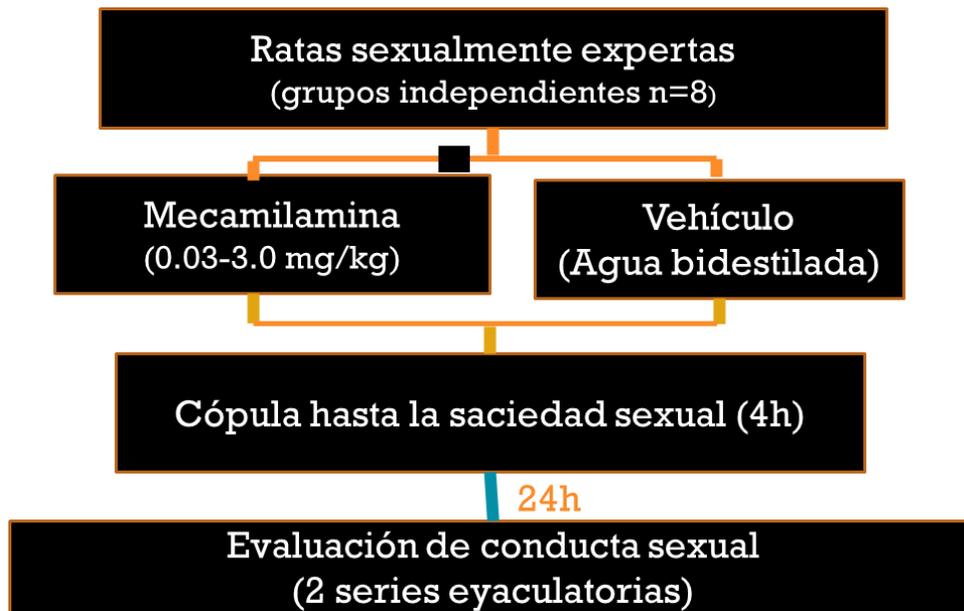
En la tabla 1 se enlistan los fármacos que se emplearon en el presente trabajo, su mecanismo de acción farmacológico, así como su vehículo y la vía por la que se administraron.

Tabla 1. Tratamientos farmacológicos

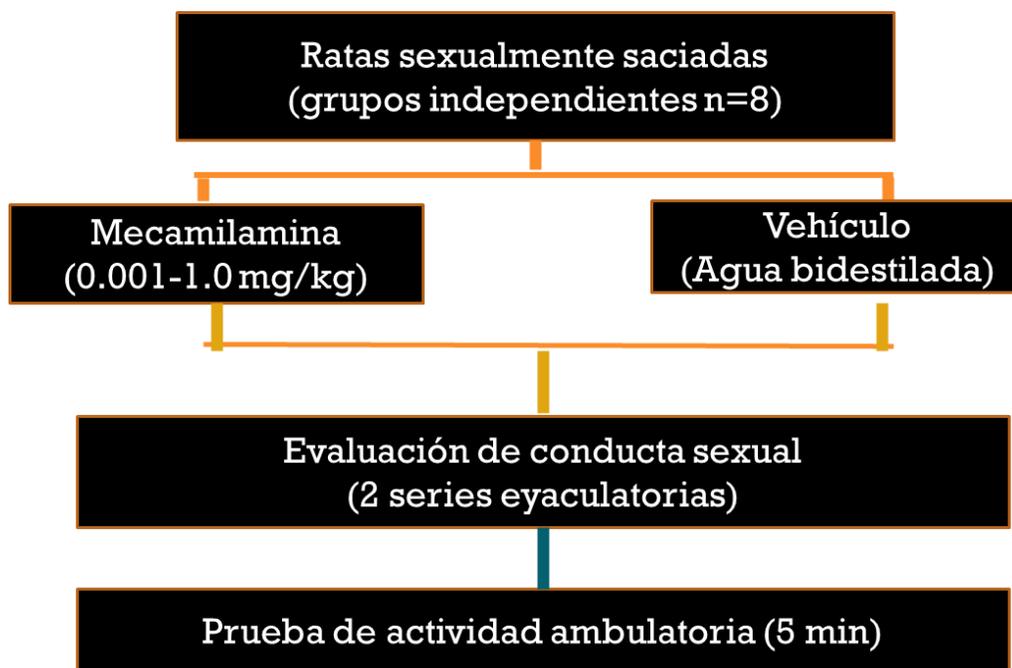
Fármaco	Mecanismo de acción	Vehículo	Vía de administración	Latencia
Haloperidol Sigma-Aldrich	Antagonista inespecífico de receptores dopaminérgicos	Agua bidestilada más tres gotas de ácido clorhídrico al 0.2 N	i.p.	30 min
Apomorfina Sigma-Aldrich	Agonista inespecífico de receptores dopaminérgicos.	Agua bidestilada	i.p.	15 min
Mecamilamina Sigma-Aldrich	Antagonista no-selectivo y no-competitivo de receptores nicotínicos.	Agua bidestilada	i.p.	20 min
Ketamina Sigma-Aldrich	Antagonista no-competitivo de receptores NMDA	Agua bidestilada	i.p.	30 min
Bicuculina FLUKA	Antagonista competitivo de receptores GABA <sub>A</sub>	Agua bidestilada	i.p.	30 min

## 6. Diseño experimental

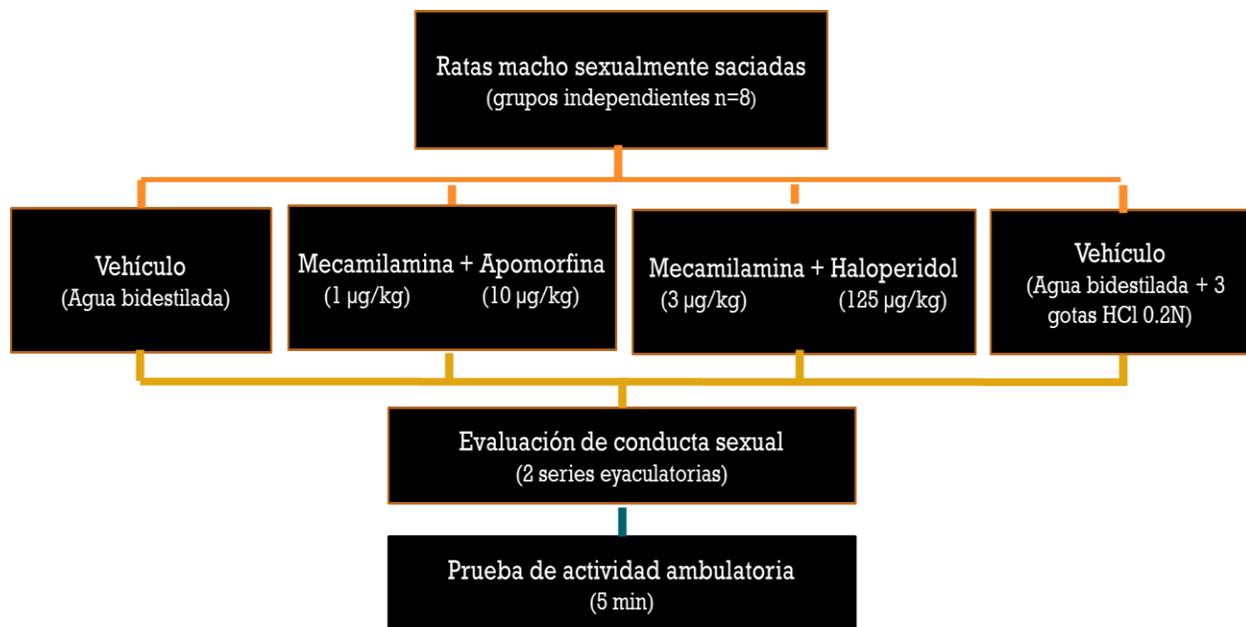
**6.1** Para determinar si el bloqueo de receptores nicotínicos durante la cópula hasta la saciedad previene el establecimiento de la inhibición sexual de ratas saciadas, se utilizaron grupos independientes de ratas macho sexualmente expertas (n= 8, cada uno) para realizar una curva dosis-respuesta del efecto de la administración sistémica del antagonista de receptores nicotínicos mecamilamina o su vehículo, inmediatamente antes de la sesión de cópula hasta la saciedad, sobre el establecimiento de la inhibición sexual. Veinticuatro horas más tarde se realizó una prueba de conducta sexual en las ratas sexualmente saciadas con una nueva hembra receptiva (ver esquema).



**6.2** Para determinar si el bloqueo de receptores nicotínicos a las 24 h post-saciedad revierte la inhibición sexual en ratas sexualmente saciadas, se utilizaron grupos independientes de ratas macho sexualmente saciadas (n= 8, cada uno) con las que se construyó una curva dosis-respuesta del efecto de la administración sistémica de mecamilamina o su vehículo, a las 24 h post-saciedad, sobre la expresión de la conducta sexual. Al finalizar el registro se sometió a los animales a una prueba de actividad ambulatoria (ver esquema).



**6.3** Para determinar una posible interacción entre los sistemas colinérgico y dopaminérgico para la reversión de la inhibición sexual a las 24 h post-saciedad, se utilizaron 2 grupos independientes de ratas macho sexualmente saciadas (n= 8), a los que se les administró una combinación de mecamilamina y del agonista inespecífico de receptores dopaminérgicos apomorfina, en dosis sub-efectivas para revertir la saciedad sexual, o sus vehículos, a las 24 h post-saciedad. Otros 2 grupos de ratas macho sexualmente saciadas (n= 8) recibieron a las 24 h post-saciedad, una dosis de mecamilamina, efectiva para revertir la saciedad sexual, junto con una dosis del antagonista dopaminérgico haloperidol que carece de efecto sobre la cópula, o sus vehículos. Al finalizar las pruebas de conducta sexual se sometió a los animales a la prueba de actividad ambulatoria (ver esquema).



## 7. Resultados

7.1 Efecto de la administración de diferentes dosis del antagonista de receptores nicotínicos, mecamilamina, sobre la conducta sexual de ratas macho sexualmente expertas (no inhibidos sexualmente).

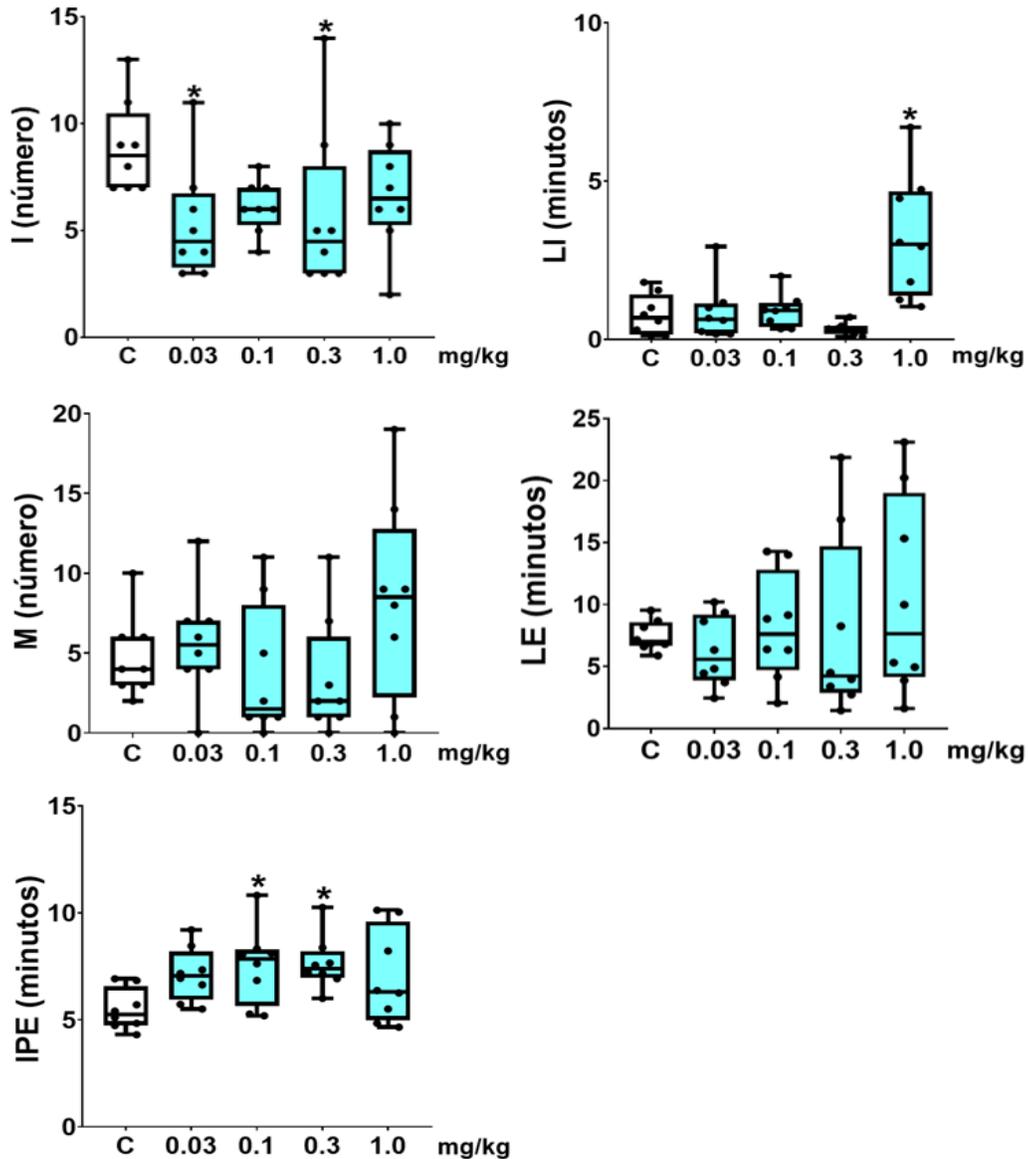


Figura 1. Parámetros específicos de la cópula de machos sexualmente expertos en respuesta al tratamiento con mecamilamina (0.03-1.0 mg/kg; n=8), comparado con el vehículo (n=8). Se presentan la latencia de intromisión (LI), el número de montas (M) y de intromisiones (I) que preceden a la eyacuación, la latencia de eyacuación (LE) y el intervalo posteyaculatorio (IPE). Los datos se expresan como medianas y rangos intercuartil. ANOVA de Kruskal-Wallis, seguido de Dunn \* $p < 0.05$  vs. control (C).

Como se puede observar en la Figura 1, la mecamilamina a dosis bajas (0.03 y 0.1 mg/kg) prácticamente no modificó la cópula. Con la dosis de 0.03 mg/kg se presentó una disminución significativa de las I y con la de 0.1 mg/kg un aumento significativo en el IPE. La dosis intermedia de 0.3 mg/kg tuvo efectos facilitadores de la cópula, pues redujo la LI, la LE, las M y las I, aunque sólo en este último parámetro la reducción alcanzó significancia estadística, y aumentó significativamente el IPE.

La dosis efectiva de mecamilamina (1.0 mg/kg) incrementó significativamente la LI y aumentó la dispersión de los datos en el resto de los parámetros en comparación con el grupo control. Finalmente probamos una dosis mayor de mecamilamina (3.0 mg/kg), que tuvo efectos claramente inhibitorios y sólo 4 de los 8 animales copularon hasta la eyaculación, dentro del tiempo esperado para animales sexualmente expertos. Estos animales presentaron un aumento en todos los parámetros, que fue particularmente evidente en la presentación de un número muy elevado de M.

## 7.2 Efecto del bloqueo de receptores nicotínicos durante la cópula hasta la saciedad sobre el establecimiento de la inhibición sexual en ratas sexualmente saciadas.

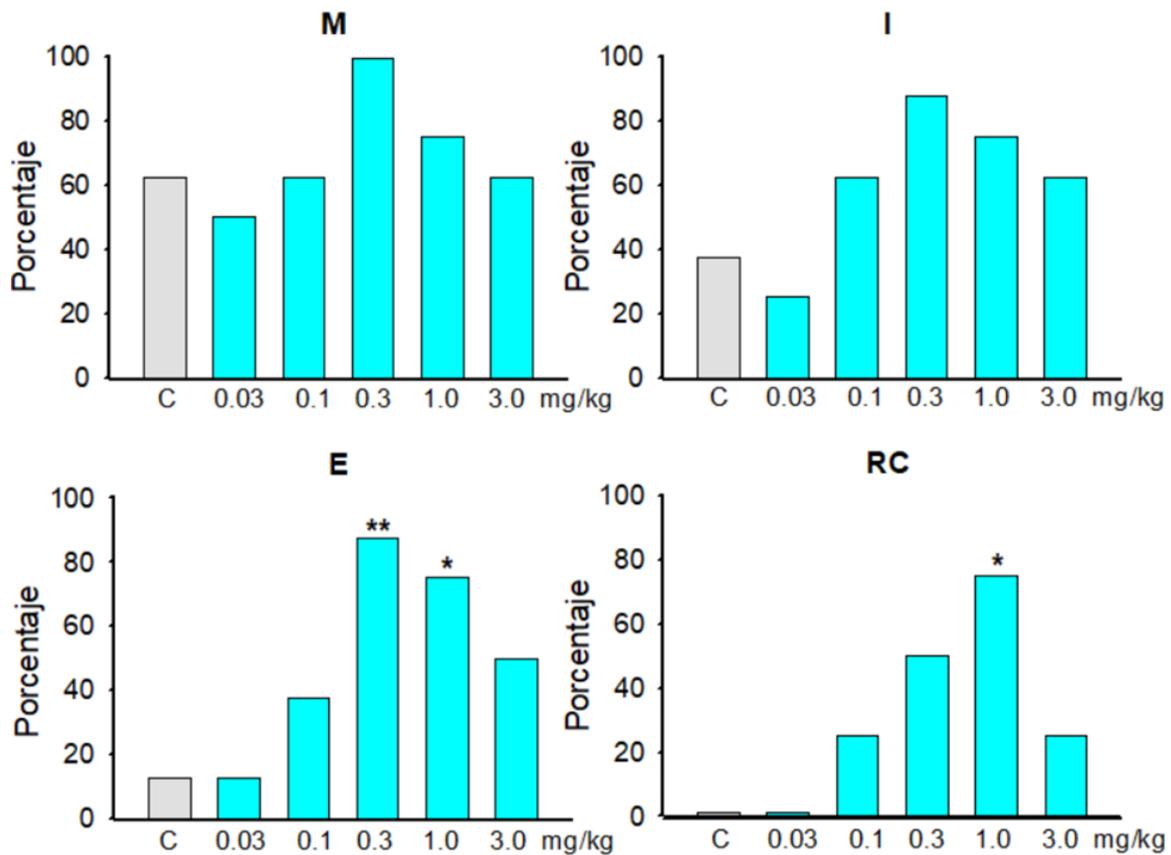


Figura 2. Porcentaje de ratas macho que copularon hasta la saciedad en presencia de diferentes dosis de mecamilamina (0.03-3.0 mg/kg) o su vehículo, que presenta las respuestas de monta (M), intromisión (I), eyacuación (E) y que reinicia la cópula después de la eyacuación (RC), a las 24 h post-saciedad;  $n=8$  cada grupo. Prueba F de Fisher \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  vs. animales control (C) administrados con el vehículo.

En la figura 2 se observa que de todas las dosis de mecamilamina probadas, sólo la dosis de 1.0 mg/kg previno el establecimiento de la inhibición sexual, ya que produjo un aumento estadísticamente significativo en el porcentaje de animales que fue capaz de eyacular y reiniciar la cópula después de la eyacuación a las 24 h post-saciedad. Se observa también que el pretratamiento con la dosis de 0.3 mg/kg de mecamilamina produjo un incremento significativo en el porcentaje de animales que presentó la respuesta de eyacuación a las 24 h post-saciedad, pero no aumentó la proporción de machos que reinició la cópula después de la eyacuación, por lo que si bien aumentó el número de animales sexualmente saciados que presentó conducta sexual, no previno el

establecimiento de la inhibición sexual. Una dosis mayor (3 mg/kg) ya no fue efectiva para prevenir la saciedad, y ocasionó un aumento muy importante en el número de montas que presentaron los animales saciados.

En la figura 3 se muestran los parámetros específicos de la cópula de aquellos machos pretratados con las dosis de 0.3 y 1.0 mg/kg de mecamilamina que presentaron conducta sexual hasta la eyaculación a las 24 h post-saciedad, en comparación con los de un grupo de animales sexualmente expertos.

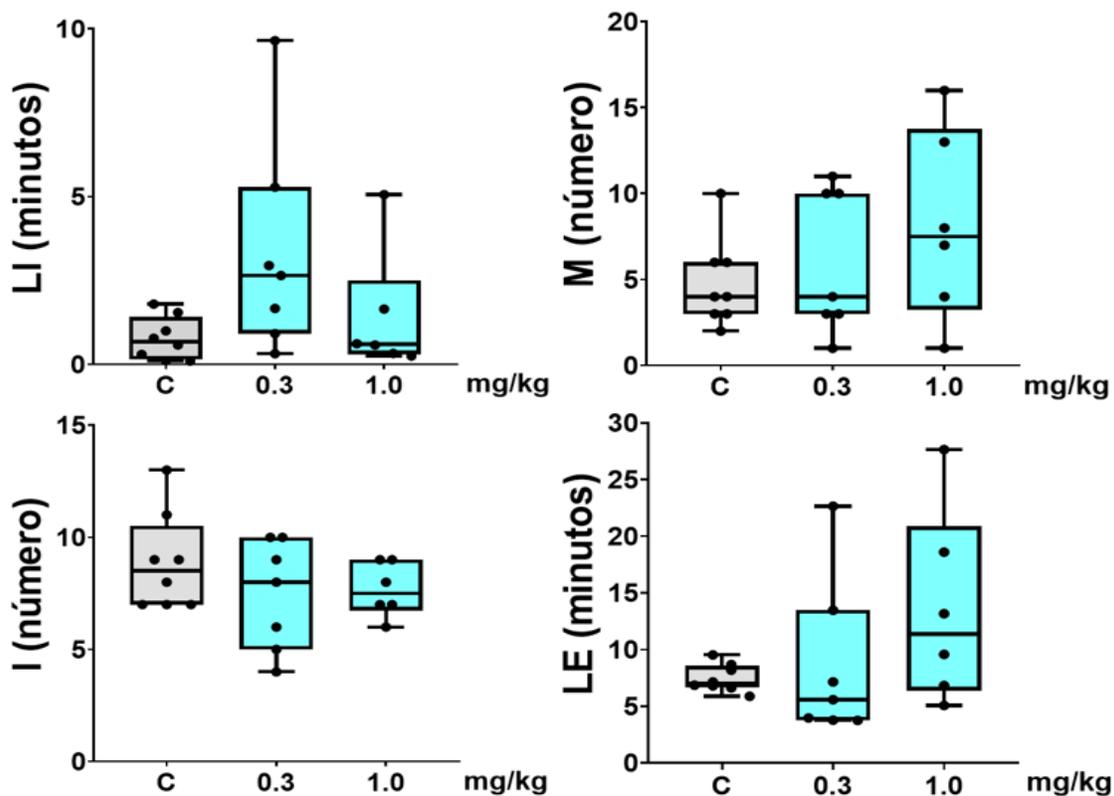


Figura 3. Parámetros específicos de la cópula de los machos que copularon hasta la saciedad en presencia de 0.3 o 1.0 mg/kg de mecamilamina (n=6-7) comparados con los de un grupo de machos sexualmente expertos como control (n=8). Se presentan la latencia de intromisión (LI), el número de montas (M) y de intromisiones (I), que preceden a la eyaculación y la latencia de eyaculación (LE). Los datos se expresan como medianas y rangos intercuartil. ANOVA de Kruskal-Wallis n.s.

No hubo diferencias significativas en ninguno de los parámetros de la cópula en comparación con los presentados por los animales sexualmente expertos, sin embargo, se observa una mayor dispersión de los datos en los 2 grupos de ratas sexualmente saciadas.

### 7.3 Efecto del bloqueo de receptores nicotínicos sobre la expresión de la cópula de ratas sexualmente saciadas

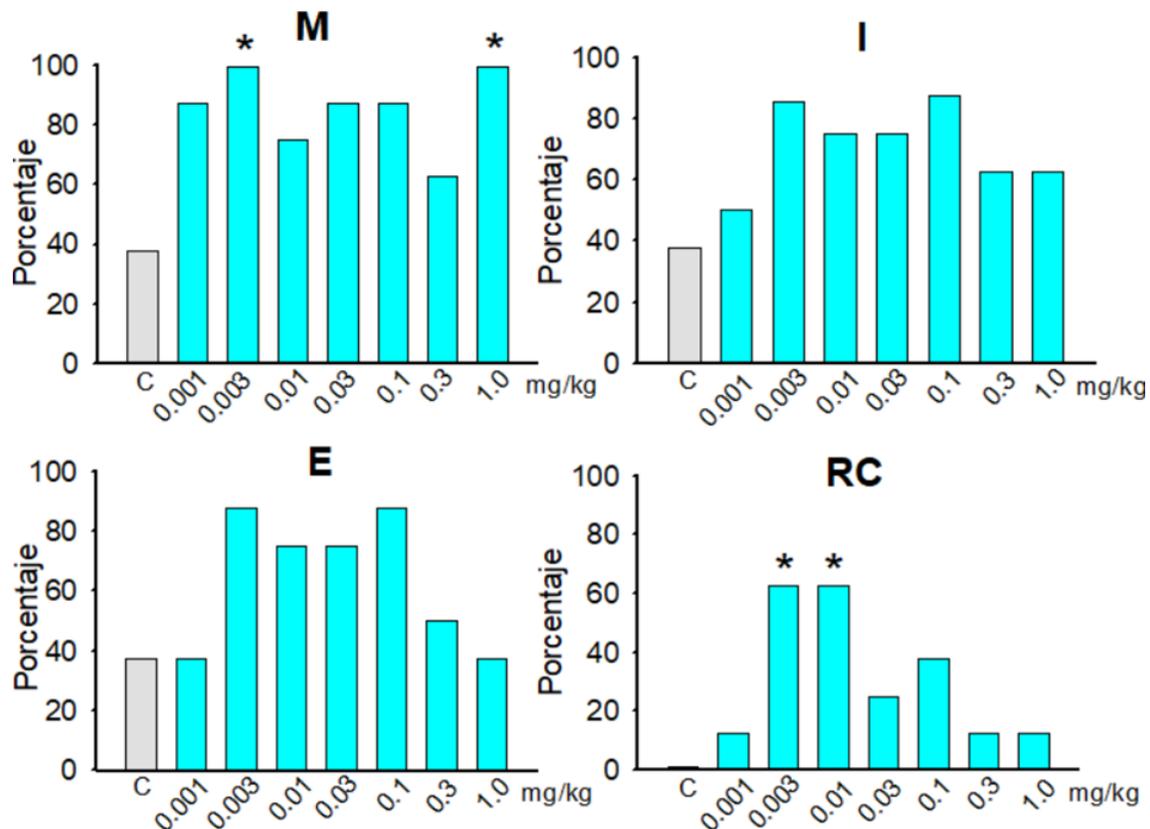


Figura 4. Porcentaje de machos sexualmente saciados que presenta las respuestas de monta (M), intromisión (I), eyacuación (E) y que reinicia la cópula después de la eyacuación (RC), en respuesta a la administración i.p. de diferentes dosis de mecamilamina (0.001-1.0 mg/kg) o su vehículo a las 24 h post-saciedad; n=8 cada grupo. Prueba F de Fisher \* $p < 0.05$  vs. control (C).

En la figura 4 se muestra que la mecamilamina, a todas las dosis probadas, aumentó el porcentaje de ratas sexualmente saciadas que presentó la conducta de monta; sin embargo, este aumento sólo alcanzó significancia estadística con las dosis de 0.003 y 1.0 mg/kg. La mecamilamina también aumentó la proporción de animales que presentó las respuestas de intromisión y de eyacuación a las dosis de 0.003 y 0.1 mg/kg, sin que dichos aumentos fueran estadísticamente significativos en comparación con el grupo control. Finalmente, la mecamilamina, a dosis bajas, revirtió la inhibición sexual de ratas saciadas a las dosis de 0.003 y 0.01 mg/kg, ya que se observa un aumento

estadísticamente significativo en el porcentaje de animales que fue capaz de reiniciar la cópula después de la eyaculación, en comparación con el grupo control.

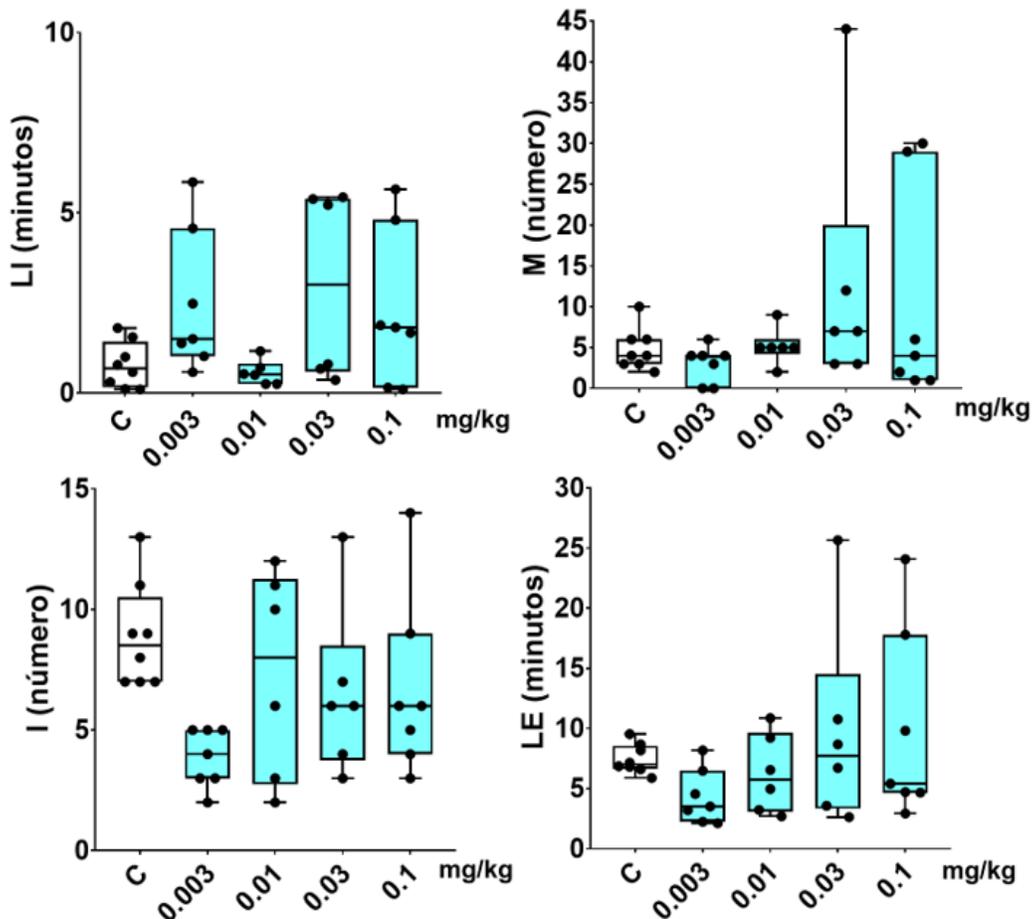


Figura 5. Parámetros específicos de la cópula de los machos sexualmente saciados que eyaculan en respuesta al tratamiento con mecamilamina (0.003-0.1 mg/kg, n=6,6,7), comparados con los de machos sexualmente expertos como control (C) (n=8). Se presentan la latencia de intromisión (LI), el número de montas (M) y de intromisiones (I) que preceden a la eyaculación y la latencia de eyaculación (LE). Los datos se expresan como medianas y rangos intercuartil. ANOVA de Kruskal-Wallis n.s.

En la figura 5 se muestran los parámetros específicos de la cópula de los machos sexualmente saciados que presentaron conducta sexual hasta la eyaculación a las 24 h post-saciedad, en comparación con los de un grupo de animales sexualmente expertos. Se puede observar que la mecamilamina no modificó significativamente ninguno de los parámetros en comparación con el grupo control. Sin embargo, se observa una gran variabilidad en los valores de cada uno de los parámetros, particularmente a las dosis más altas de mecamilamina.

#### 7.4 Interacción entre los sistemas colinérgico y dopaminérgico para la reversión de la inhibición sexual en ratas sexualmente saciadas.

Con el objeto de determinar la posible interacción entre la transmisión colinérgica y dopaminérgica para la reversión de la saciedad sexual, se analizó el efecto de la combinación de dosis sub-efectivas del agonista dopaminérgico apomorfina y de mecamilamina, así como de la combinación de una dosis efectiva de mecamilamina y el antagonista dopaminérgico haloperidol.

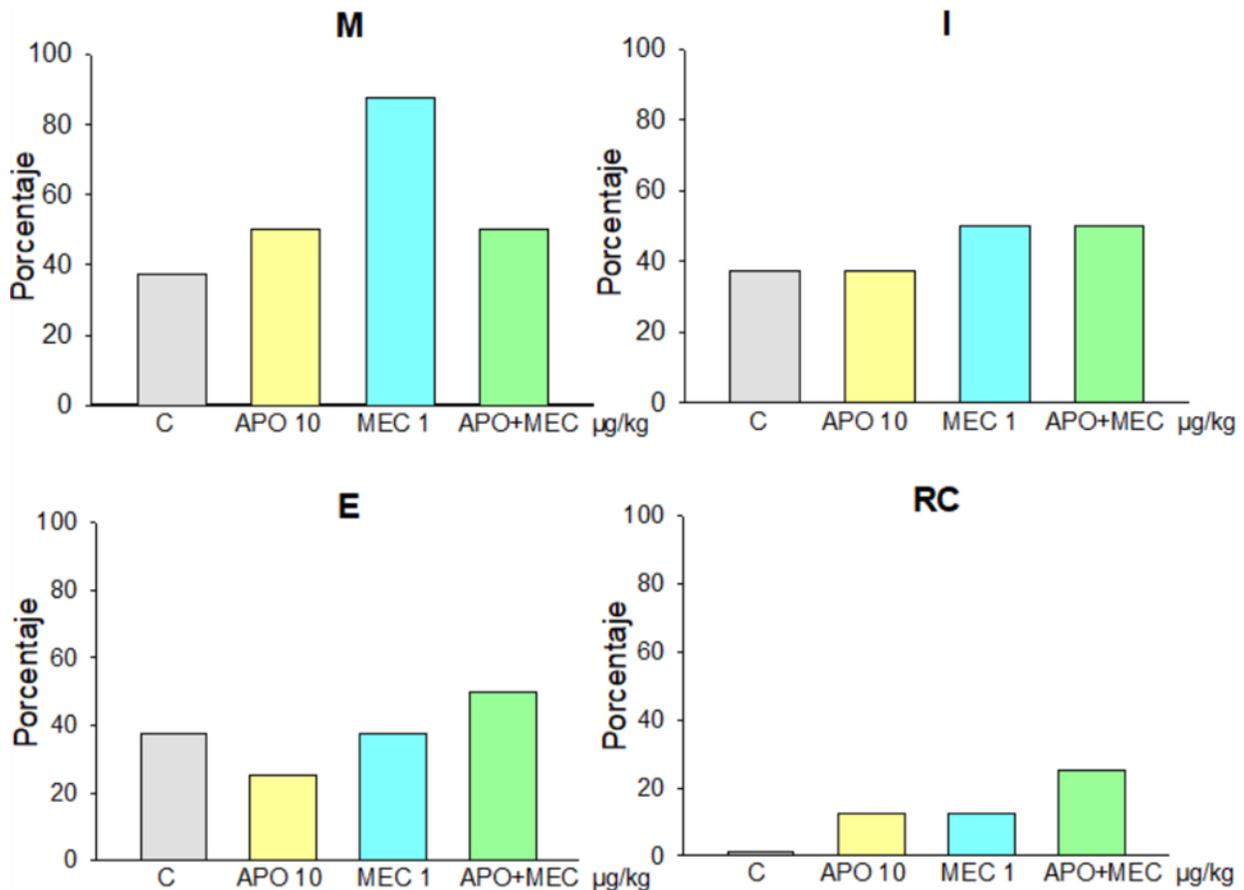


Figura 6. Porcentaje de machos sexualmente saciados que presenta las respuestas de monta (M), intromisión (I), eyaculación (E) y que reinicia la cópula después de la eyaculación (RC), en respuesta a la administración i.p. de la combinación de dosis sub-efectivas de mecamilamina (1.0 µg/kg) y de apomorfina (10 µg/kg), o agua bidestilada como control (C), n=8 cada grupo. Prueba F de Fisher n.s.

Como se puede observar en la figura 6, la administración de la combinación de apomorfina y mecamilamina no aumentó la proporción de ratas sexualmente saciadas que presentó actividad sexual, indicando la ausencia de interacción.

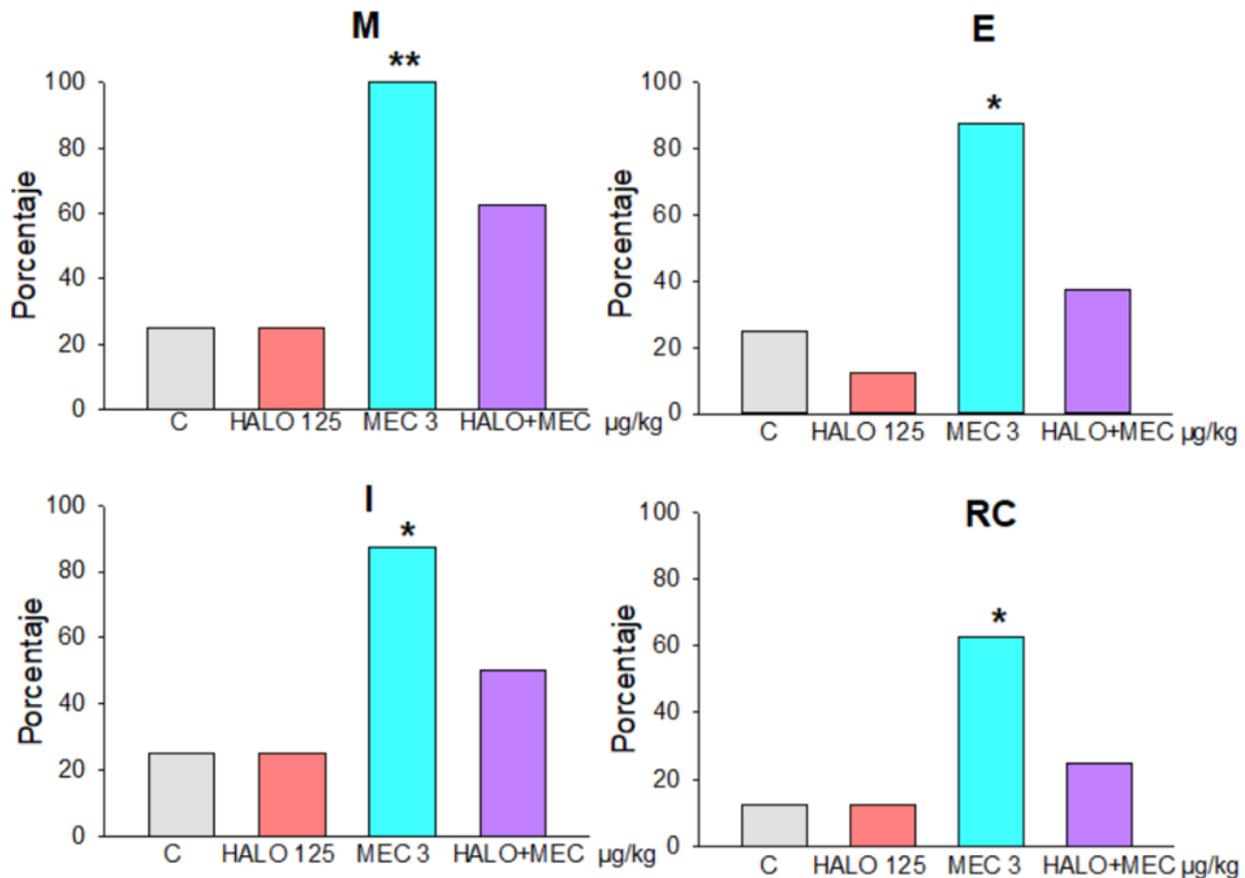


Figura 7. Porcentaje de machos sexualmente saciados que presenta las respuestas de monta (M), intromisión (I), eyacuación (E) y que reinicia la cópula después de la eyacuación (RC), en respuesta a la administración i.p. de la combinación de una dosis efectiva de mecamilamina (3.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) con haloperidol (125  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), o agua bidestilada como control (C),  $n=8$  cada grupo. Prueba F de Fisher \* $p<0.05$  \*\* $<0.01$  vs. C.

En la figura 7 se aprecia que el haloperidol bloquea la reversión de la saciedad inducida por mecamilamina, ya que el aumento en la proporción de animales sexualmente saciados que reiniciar la cópula después de la eyacuación inducido por la dosis de 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de mecamilamina administrada de manera individual, se cancela cuando se coadministra con el antagonista de receptores dopaminérgicos.

El análisis de la actividad ambulatoria espontánea de los animales sexualmente saciados, tratados con diferentes dosis de mecamilamina, mostró que con las dosis de

0.1 y 1.0 mg/kg se produjo un aumento significativo en la actividad en comparación con el grupo control tratado con vehículo (tabla 2).

Tabla 2. Actividad ambulatoria espontánea de machos sexualmente saciados tratados con diferentes dosis de mecamilamina

Actividad ambulatoria		
Grupo	Dosis	Media ± EE
Vehículo	-	35.1 ± 1.8
Mecamilamina (i.p.)	0.001 mg/kg	36.7 ± 3.0 n.s.
	0.003 mg/kg	32.6 ± 2.2 n.s.
	0.01 mg/kg	44.7 ± 5.0 n.s.
	0.03 mg/kg	43.2 ± 3.9 n.s.
	0.1 mg/kg	49.7 ± 2.7 *p<0.05
	0.3 mg/kg	46.1 ± 3.2 n.s.
	1.0 mg/kg	51.6 ± 3.0 **p<0.01

La actividad se presenta como la media ± EE del número de cruces por minuto (CPM). ANOVA de una vía, post-hoc Holm-Sidak \*p<0.05, \*\*p<0.05 vs. vehículo.

Por otro lado, el análisis del efecto de las distintas combinaciones farmacológicas sobre la actividad locomotora mostró que ninguna de ellas modificó significativamente la actividad ambulatoria espontánea de los machos sexualmente saciados en comparación con los vehículos respectivos (tabla 3).

Tabla 3. Actividad ambulatoria espontánea de machos sexualmente saciados tratados con combinaciones de fármacos

Actividad ambulatoria		
Grupo	Dosis	cpm (media ± EE)
Vehículo (agua bidestilada)	-	35.1 ± 1.8
Mecamilamina + Apomorfina	1 µg/kg + 10 µg/kg	38.8 ± 1.8
Mecamilamina	1 µg/kg	36.7 ± 3.0
Apomorfina	10 µg/kg	38.8 ± 2.0
Vehículo (agua bidestilada + 2 gotas HCL 0.2N)	-	39.8 ± 2.7
Mecamilamina + Haloperidol	3 µg/kg + 125 µg/kg	33.1 ± 2.7
Mecamilamina	3 µg/kg	32.6 ± 2.2
Haloperidol	125 µg/kg	35.6 ± 2.4

La actividad se expresa como la media ± EE del número de cruces por minuto (cpm). ANOVA de una vía, n.s.

## 8. Discusión

Esta investigación exploró la participación de los receptores nicotínicos en la regulación de la expresión de la conducta sexual de ratas macho sexualmente expertas y sexualmente saciadas, utilizando un antagonista no selectivo y no competitivo de nAChR, la mecamilamina.

Los principales hallazgos obtenidos fueron los siguientes:

- El bloqueo de nAChR produce efectos bifásicos, dependientes de la dosis, sobre la conducta sexual de ratas macho sexualmente expertas.
- El bloqueo de nAChR previo a la cópula hasta la saciedad, previene el establecimiento de la inhibición sexual a las 24 h post-saciedad.
- La inhibición sexual establecida a las 24 h post-saciedad, se revierte por un antagonista de nAChR.
- La reversión de la saciedad producida por el antagonista de nAChR no ocurre cuando se coadministra un antagonista de receptores dopaminérgicos.
- La combinación de dosis sub-efectivas del antagonista de nAChR y de un agonista de receptores dopaminérgicos no sinergizan para revertir la saciedad sexual.

El bloqueo de nAChR con mecamilamina en machos sexualmente expertos tiene efectos variados sobre la cópula, que dependen de la dosis administrada. Así, dosis bajas produjeron una tendencia a reducir el umbral eyaculatorio, mientras que las dosis altas (1-3 mg/kg) tuvieron efectos inhibitorios, entre los que destacó que los animales presentaron un número muy elevado de montas (M), sin lograr la intromisión. Este aumento en el número de M sugiere problemas de erección, puesto que para que un macho logre la inserción peneana intravaginal se requiere que primero logre la erección del pene (Brennan & Orbach, 2020), lo cual depende en parte de la activación de receptores nAChR en la unión neuromuscular (Bozkurt et al., 2007; Ozturk Fincan et al., 2010). En apoyo a esta interpretación está el reporte de anestesia clínica, que muestra que la activación de nAChR musculares con succinilcolina es seguida de su rápida desensibilización, observada como flacidez muscular (Jonsson et al., 2006). La relajación del músculo liso del cuerpo cavernoso del pene y de la arteria cavernosa son críticos

para inducir y mantener la erección peneana (Andersson & Wagner, 1995; Saenz de Tejada, 2002). Se ha demostrado que la nicotina potencia la relajación del cuerpo cavernoso de conejo, estimulando la liberación de óxido nítrico (Bozkurt et al., 2007) y que la mecamilamina bloquea este aumento en la relajación inducido por nicotina (Ozturk Fincan et al., 2010). Por lo tanto, es posible que las dosis altas de mecamilamina utilizadas en este trabajo hayan interferido con la relajación del cuerpo cavernoso en las ratas al bloquear los nAChR, interfiriendo con la erección, lo que dificultó la ejecución de la cópula. En cambio, las dosis bajas de mecamilamina parecen no haber interferido con la erección, permitiendo observar el efecto facilitador del bloqueo de los nAChR sobre la cópula. Por otro lado, la presentación de un número elevado de M puede ser indicativo de una motivación sexual aumentada (Carro-Juárez et al., 2004), ya que, a pesar de no lograr la inserción peneana intravaginal, los animales siguen manteniendo el interés sexual en las hembras, por lo que podemos proponer que las dosis altas de mecamilamina facilitan la motivación sexual (Carro-Juárez et al., 2004), pero interfieren con la ejecución de la cópula.

En cuanto a los machos sexualmente saciados, los resultados de esta investigación muestran que el bloqueo de nAChR con mecamilamina previo a la cópula hasta la saciedad, interfiere con el establecimiento de la inhibición sexual 24 h más tarde. Este dato muestra que durante la cópula repetida hay liberación de acetilcolina (ACh) que contribuye al establecimiento de dicha inhibición, a través de activar nAChR.

Está bien demostrado que durante la cópula se presenta un aumento en la liberación de DA en el NAcc (Mas et al., 1990; Pfaus et al.1990; Pleim et al., 1990) y que, durante la cópula hasta la saciedad, los niveles de DA se mantienen elevados en esta región (Fiorino et. al. 1997; Canseco-Alba et al. 2021). Evidencia acumulada sugiere que existe un equilibrio dinámico entre la ACh y la DA en el NAcc para la regulación de las respuestas a estímulos recompensantes naturales y la aversión condicionada (Hoebel et.al. 2007; Mark et. al. 1991; 1992; 1995; 2011). El incremento en la liberación de DA en el NAcc que se presenta cuando el animal está frente a un estímulo recompensante está sujeto a una modulación importante por parte de los sistemas colinérgicos (Liss & Roeper, 2010; Zhang & Sulzer, 2004). Así, se ha demostrado que el bloqueo de nAChR

por la administración sistémica de mecamilamina, impide el incremento de DA en NAcc ocasionado por la administración intracerebral de nicotina en ratas (Mifsud et al., 1989). Por lo tanto, si bien no existe evidencia clara acerca del papel de los nAChR en la regulación de la cópula, la participación de estos receptores en la regulación de la liberación de DA en el NAcc pudiera proponerse como el mecanismo a través del cual los nAChR modulen esta conducta.

Estudios en rebanadas de cerebro de rata han mostrado que la activación de nAChR del NAcc provoca un incremento en la tasa de disparo de interneuronas GABAérgicas, lo que da por resultado un aumento de la frecuencia de corrientes postsinápticas inhibitorias espontáneas (sIPSC) en las MSN (de Rover et al., 2002).

Tomando en cuenta podría pensarse que uno de los mecanismos por los que la mecamilamina pudiera interferir con el establecimiento de la inhibición sexual en los animales sexualmente saciados sería bloqueando a los nAChR- $\alpha_4\beta_2$  de estas interneuronas en el NAcc y, con ello, cancelar la inhibición GABAérgica que ejercen sobre las MSN a través de los receptores GABA<sub>A</sub> (que podría contribuir al establecimiento de la inhibición sexual), así como la actividad inhibitoria que ejerce la transmisión GABAérgica sobre las terminales DAérgicas y glutamatérgicas del NAcc, a través de la activación de receptores GABA<sub>B</sub> presinápticos (Covey & Yocky, 2021).

Por otro lado, el bloqueo de los nAChR- $\alpha_4\beta_2$  de las interneuronas GABAérgicas del ATV podría contribuir a la estimulación de las neuronas DAérgicas al eliminar la influencia inhibitoria de GABA (de Rover et al., 2002).

El bloqueo de nAChR con mecamilamina durante la cópula hasta la saciedad, interfirió con el establecimiento de la inhibición sexual solamente a la dosis de 1 mg/kg. A dosis menores o mayores del antagonista este efecto se pierde. Se ha demostrado que dosis bajas de antagonistas nAChR mimetizan la función de la nicotina para desensibilizar a los nAChR (Buccafusco & Jackson, 1991; Terry et al., 1999). Por lo tanto, una posible explicación para este resultado es que los receptores nAChR- $\beta_2$ , presentes en las neuronas y terminales GABAérgicas del ATV y el NAcc, al presentar mayor afinidad por el agonista, se bloqueen con la dosis efectiva del antagonista de nAChR, sin que se

afecte la función de los nAChR- $\alpha_7$  de las terminales glutamatérgicas, por presentar una afinidad menor. Las dosis de mecamilamina menores a la que previene el establecimiento de la inhibición sexual podrían considerarse sub-efectivas, mientras que a las dosis de mecamilamina mayores a la efectiva, los nAChR- $\alpha_7$  se bloquearían también y eso pudiera cancelar la prevención de la inhibición sexual. También podría considerarse que las dosis mayores de mecamilamina produzcan efectos inespecíficos por el bloqueo de los nAChR a nivel neuromuscular. Habrá que hacer experimentos específicos para determinar ambas posibilidades.

Los resultados de este estudio también muestran que dosis bajas de mecamilamina revierten la inhibición sexual a las 24 h post-saciedad, lo que indica que la ACh participa en el mantenimiento de la inhibición sexual a través de activar a los nAChR.

El hecho de que el bloqueo de los nAChR revierta la inhibición sexual de ratas saciadas indica que estos receptores están siendo estimulados por ACh durante este estado inhibitorio. Si bien en nuestro estudio el antagonista de nAChR se administró por vía sistémica y eso no nos permite establecer el área o las áreas cerebrales en las que pudo haber actuado, se ha reportado que el aumento sostenido de ACh en el NAcc está asociado a la inhibición de conductas apetitivas (Mark et al., 1995; Mark et al., 1991). Por otro lado, durante la saciedad por comida se registra tanto un aumento en la actividad de las CIN (Mark et al., 2011), como en los niveles de ACh en el NAcc (Di Chiara et al., 1994; de Rover et al., 2002). Por el contrario, los estímulos que promueven conductas motivadas pausan la actividad de las CIN en el NAcc (Morris, et al., 2004; Joshua, et al., 2008; Nougaret & Ravel, 2015). Con base en estos datos podría pensarse que los animales sexualmente saciados presenten niveles elevados de ACh en el NAcc, de manera análoga a lo que ocurre en ratas saciadas por comida, y que dicha ACh contribuya a mantener la inhibición sexual a través de activar a los nAChR. El bloqueo de estos receptores con mecamilamina equivaldría a pausar la actividad de las CINs, que es lo que ocurre durante la promoción de conductas motivadas. La ACh regula la expresión de conductas motivadas, como lo es la conducta sexual, en el NAcc modulando la liberación de DA a través de activar a los nAChR (Threlfell et al., 2012).

Será necesario realizar experimentos en los que se administre la mecamilamina directamente en el NAcc para comprobar esta hipótesis.

Otro posible mecanismo a través del cual la mecamilamina podría revertir la inhibición sexual de ratas saciadas pudiera deberse a que a esas dosis estuviese bloqueando nAChR- $\alpha_4\beta_2$  en el ATV limitando la actividad GABAérgica, sin afectar a los nAChR- $\alpha_7$  de las terminales glutamatérgicas, dando por resultado un aumento de la actividad de las neuronas DAérgicas, que incremente la liberación de DA en el NAcc.

El análisis de la actividad ambulatoria espontánea de las ratas sexualmente saciadas tratadas con mecamilamina muestra que dosis específicas (0.1 y 1.0 mg/kg), que no revirtieron la saciedad sexual, produjeron un aumento significativo en la actividad locomotora. Sin embargo, es la disminución en la actividad locomotora la que interfiere principalmente con la ejecución de la cópula, y no el aumento moderado de ésta. En apoyo a la idea de que este no fue un factor que afectara la reversión de la saciedad, otras dosis de mecamilamina, menores y mayores a las mencionadas, no afectaron la actividad ambulatoria y tampoco revirtieron la saciedad sexual.

Tomando en cuenta la extensa evidencia que demuestra la interacción entre los sistemas colinérgico y dopaminérgico en el MSL, realizamos experimentos con dosis sub-efectivas del antagonista nicotínico en combinación con dosis sub-efectivas de un agonista dopaminérgico para revertir la saciedad, así como de una dosis efectiva de mecamilamina en combinación con un antagonista dopaminérgico, con el propósito de investigar la posible interacción entre ambos sistemas para la reversión de la saciedad sexual.

El antagonista dopaminérgico inespecífico haloperidol, que no revierte la saciedad sexual por sí mismo (Rodríguez-Manzo, 1999), bloqueó la reversión producida por una dosis efectiva de mecamilamina. Este dato sugiere que el mecanismo a través del cual la mecamilamina revierte la saciedad sexual involucra la liberación de DA, lo que apoya la hipótesis de que la reversión de la saciedad producida por mecamilamina depende, en última instancia, de la transmisión DAérgica.

Nuevamente, los tratamientos combinados fueron administrados por vía sistémica y no es posible determinar en qué área(s) cerebral(es) hayan actuado, sin embargo, el hecho de que se haya demostrado que en los animales sexualmente saciados los niveles de DA en el NAcc están disminuidos significativamente (Canseco-Alba, 2016) y, que la activación de receptores DAérgicos en esta región cerebral revierte la saciedad sexual (Guadarrama-Bazante & Rodríguez-Manzo, 2019), nos permite proponer que el NAcc pudiera ser el sitio en el que la mecamilamina estuviera actuando para revertir la saciedad a través de aumentar la liberación de DA y que el haloperidol estaría cancelando dicha reversión al bloquear a los receptores DAérgicos del NAcc.

Por otro lado, la combinación de dosis sub-efectivas del agonista DAérgico inespecífico apomorfina y de mecamilamina, no actuaron en conjunto para revertir la saciedad sexual. Este resultado pareciera contradecir la idea de la hipótesis anterior, no obstante, una posible explicación para la falta de interacción entre ambos fármacos pudiera estar relacionada con la dosis de apomorfina utilizada. Se ha reportado que la administración sistémica de dosis bajas de apomorfina disminuye la actividad de las neuronas DAérgicas, a través de activar autorreceptores somatodendríticos en el ATV y que inhibe la liberación de DA en el NAcc al activar autorreceptores en las terminales DAérgicas (Akaoka et al., 1992; Bunney et al., 1973; Fresnoza et al., 2021; Ford, 2014). En este trabajo tuvimos que utilizar, en la combinación, una dosis baja de apomorfina para que fuera sub-efectiva para revertir la saciedad sexual y poder establecer si actuaba en conjunto con una dosis sub-efectiva de mecamilamina para revertir la inhibición sexual. Podría pensarse entonces, que el incremento en la liberación de DA en el NAcc que produciría la mecamilamina al bloquear nAChR- $\alpha_4\beta_2$  (Straub et al., 2014; Lee et al., 2020), haya sido cancelado por la activación de autorreceptores presinápticos D2 y por ello no se produjo la reversión de la saciedad sexual. Nuevamente, esta hipótesis deberá ser comprobada con la administración intra-NAcc de estos tratamientos combinados.

En conjunto, estos mecanismos apuntan a que la vía final para la reversión de la saciedad mediada por mecamilamina depende de la liberación de DA.

De manera interesante, las dosis de mecamilamina requeridas para revertir la inhibición sexual ya establecida fueron dos órdenes de magnitud menores que la requerida para

prevenir su establecimiento. Esta diferencia en la potencia correlaciona con la hipersensibilidad a fármacos que de manera reiterada se ha reportado que caracteriza a las ratas macho sexualmente saciadas, al compararlas con ratas sexualmente expertas (Rodríguez-Manzo et al. 2011; González-Morales & Rodríguez-Manzo, 2020; Rodríguez-Manzo et al., 2021). Así, en las ratas sexualmente expertas que se sometieron al proceso de cópula hasta la saciedad, se requirió de una dosis mucho mayor de mecamilamina para bloquear el establecimiento de la inhibición sexual, que las necesarias para revertirla cuando los animales ya estaban sexualmente saciados. Al igual que para la prevención de la saciedad sexual, el efecto de reversión de la inhibición sexual se observó sólo con un par de dosis bajas de mecamilamina y a dosis mayores el efecto se perdió. Como ya se mencionó, existen datos en la literatura que muestran que la mecamilamina a concentraciones bajas actúa como agonista de receptores nicotínicos y por ello, la desensibilización de los nAChR podría jugar un papel en la pérdida del efecto con dosis de mecamilamina mayores a la efectiva, en los animales sexualmente saciados. Más aún, estas últimas dosis produjeron un aumento en las M, similar al observado en machos expertos con cantidades 100 veces más grandes de mecamilamina, un dato que también revela la hipersensibilidad a fármacos de los machos sexualmente saciados.

La actividad de las CIN también es regulada por el sistema glutamatérgico; el glutamato estimula el disparo en ráfaga de las CIN (Marchi et al., 2015; Yan et al., 2018; Benarroch, 2012). Por otro lado, se ha descrito que, en el NAcc, las proyecciones GABAérgicas que provienen del ATV (Morales & Margolis, 2017) están involucradas en la interrupción del consumo de recompensas; al activarse este sistema se interrumpe la búsqueda de recompensas (van Zessen et al., 2012). Bloquear a los receptores NMDA, impediría el disparo en ráfaga de las CIN (equivalente a pausar su actividad) lo que podría sumarse al efecto de mecamilamina de bloquear nAChR. Por otro lado, el bloqueo de receptores GABA<sub>A</sub> con bicuculina interferiría con la interrupción del consumo de recompensas y podría también sumarse al efecto de mecamilamina.

Partiendo de esta información decidimos hacer un par de experimentos piloto dirigidos a explorar la posible interacción de estos sistemas para la reversión de la saciedad. En

éstos, utilizamos animales sexualmente saciados a los que les administramos, por un lado, dosis sub-efectivas de un antagonista de receptores NMDA (ketamina) y de mecamilamina y, por el otro, dosis sub-efectivas de un antagonista GABA<sub>A</sub> (bicuculina) y de mecamilamina. Ninguna de estas combinaciones logró revertir la inhibición sexual de los machos saciados (Figuras 10 y 11 en Anexo 1). Si bien se trata de resultados negativos, esta es una primera aproximación al estudio de estas posibles interacciones.

## 9. Conclusiones

- Los nAChR participan en la regulación de la conducta sexual de ratas sexualmente expertas, de manera dependiente de la dosis, facilitándola a dosis bajas e inhibiéndola a dosis altas.
- Durante la cópula hasta la saciedad hay liberación de ACh que contribuye al establecimiento de la inhibición sexual, a través de la activación de nAChR.
- La ACh participa en el mantenimiento de la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas a través de activar nAChR.
- Los sistemas colinérgico y dopaminérgico parecen interactuar para la reversión de la inhibición sexual de ratas saciadas, producida por un antagonista de receptores nicotínicos.

## 10. Perspectivas

Este proyecto representa el primer acercamiento a la participación del sistema colinérgico en el fenómeno de saciedad sexual y deja muchas puertas abiertas a la exploración. Es necesario realizar experimentos adicionales que complementarían la información recabada en este trabajo. Para poder determinar si los animales tratados con dosis altas de mecamilamina tienen un problema de erección, podemos administrar diferentes dosis previo a la prueba de erección sin contacto.

Sería necesario determinar la participación de los nAChR del NAcc y del ATV en el establecimiento y en la reversión de la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas a través de administraciones intra-NAcc e intra-ATV, respectivamente. Es igualmente importante establecer la participación de los nAChR- $\alpha_4\beta_2$  y de los nAChR- $\alpha_7$  en la saciedad sexual a través de la utilización de antagonistas específicos para cada uno de ellos. Para poder descartar que la interacción entre el sistema colinérgico interactúe con los sistemas GABAérgico y glutamatérgico, para la reversión de la saciedad sexual, se tendrían que probar distintas dosis de los antagonistas GABA<sub>A</sub> y NMDA en combinación con la mecamilamina.

Así mismo, se podría determinar la participación de la activación y desensibilización de nAChR, en los animales saciados, a través de administrar diferentes dosis de un agonista nicotínico, para determinar puntos de comparación entre las similitudes farmacológicas de antagonistas nicotínicos, como mecamilamina, y nicotina. Finalmente, utilizando microdiálisis, se podrían estudiar:

- Cambios en los niveles de ACh en el NAcc durante la cópula hasta la saciedad
- Determinar las concentraciones de ACh en el NAcc de ratas sexualmente saciadas y compararlas con las de ratas que eyacularon una sola vez el día anterior
- Registrar cambios en los niveles de DA del NAcc de ratas sexualmente saciadas en respuesta a la administración sistémica de una dosis de mecamilamina efectiva para revertir la inhibición sexual

## 11. Referencias

Akaoka, H., Charléty, P., Saunier, C.F., Duda, M., Chouvet, G. (1992). Inhibition of nigral dopamine neurons by systemic and local apomorphine: Possible contribution of dendritic autoreceptors. *Neuroscience*, 49: 879-891.

Al-Hasani, R., Gowrishankar, R., Schmitz, G.P., Pedersen, C.E., Marcus, D.J., Shirley, S.E., Hobbs, T.E., Elerding, A.J., Renaud, S.J., Jing, M., Li, Y., Alvarez, V.A., Lemos, J.C., Bruchas, M.R. (2021). Ventral tegmental area GABAergic inhibition of cholinergic interneurons in the ventral nucleus accumbens shell promotes reward reinforcement. *Nature neuroscience*, 24: 1414-1428.

Andersson, K.E. & Wagner, G. (1995). Physiology of penile erection. *Physiological Reviews*, 75: 191-236.

Aosaki, T., Miura, M., Suzuki, T., Nishimura, K., Masuda, M. (2010). Acetylcholine-dopamine balance hypothesis in the striatum: an update. *Geriatrics & Gerontology International*, 10: S148–S157.

Aosaki, T; Tsubokawa, H; Ishida, A; Watanabe, K; Graybiel, A.M; Kimura, M. (1994). Responses of tonically active neurons in the primate's striatum undergo systematic changes during behavioral sensorimotor conditioning. *Journal of neuroscience*, 14: 3969–3984.

Azam, L., Winzer-Serhan, U., & Leslie, F. (2003). Co-expression of alpha7 and beta2 nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs within rat brain cholinergic neurons. *Neuroscience*, 119: 965-977.

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.

Barclay, J.W., Morgan, A., Burgoyne, R.D. (2005). Calcium-dependent regulation of exocytosis. *Cell Calcium*, 38: 343–353.

Barrot, M. (2014). The ventral tegmentum and dopamine: a new wave of diversity. *Neuroscience*, 282: 243-247.

Beier, K., Steinberg, E., DeLoach, K., Xie, S., Miyamichi, K., Schwarz, L., Luo, L. (2015). Circuit architecture of VTA dopamine neurons revealed by systematic input-output mapping. *Cell*, 162: 622-634.

- Benarroch, E. (2012). Effects of acetylcholine in the striatum: recent insights and therapeutic implications. *Neurology*, 79: 274-281.
- Berridge, K. C., & Kringlebach, M. L. (2015). Pleasure systems in the brain. *Neuron*, 86(3), 646–664.
- Berridge, K. C., & Robinson, T. E. (1998). What is the role of dopamine in reward: Hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Research Reviews*, 28, 309–369.
- Bolam, J.P. (1984). Synapses of identified neurons in the neostriatum. *Ciba Foundation Symposium*, 107: 30–47.
- Bozkurt, N.B., Vural, I.M., Sarioglu, Y., Pekiner, C. (2007). Nicotine potentiates the nitroergic relaxation responses of rabbit corpus cavernosum tissue via nicotinic acetylcholine receptors. *European Journal of Pharmacology*, 558: 172-178.
- Brennan, P.L., & Orbach, D.N. (2020). Chapter three: Copulatory behavior and its relationship to genital morphology. *Advances in the Study of Behavior*. Academic Press, 52: 65-122.
- Brimblecombe, K., Threlfell, S., Dautan, D., Kosillo, P., Mena-Segovia, J., Cragg, S. (2018). Targeted Activation of cholinergic interneurons accounts for the modulation of dopamine by striatal nicotinic receptors. *eNeuro*, 30: 1- 9.
- Bromberg-Martin, E., Matsumoto, M., & Hikosaka, O. (2010). Dopamine in motivational control: rewarding, aversive and alerting. *Neuron*, 68: 815-834.
- Buccafusco, J.J. & Jackson, W.J. (1991). Beneficial effects of nicotine administered prior to a delayed matching-to-sample task in young and aged monkeys. *Neurobiology of Aging* 12: 233–238.
- Buccafusco, J.J., Beach, J.W., Terry, A. J. (2009). Desensitization of nicotinic acetylcholine receptors as a strategy for drug development. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 328: 364-370.
- Bunney, B.S., Aghajanian, G.K., Roth, R.H. (1973). Comparison of effects of L-Dopa, Amphetamine and Apomorphine on Firing Rate of Rat Dopaminergic Neurons. *Nature New Biology*, 245: 123-125.
- Cachope, R. M. & Cheer, J.F. (2014). Local control of striatal dopamine release. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8: 188.

- Cachope, R. M., Mathur, B., Irving, J., Wang, H., Morales, M., Lovinger, D., & Cheer, J. (2012). Selective activation of cholinergic interneurons enhances accumbal phasic dopamine release: setting the tone for reward processing. *Cell Report*, 2: 33-41.
- Canseco-Alba, A. (2016). Los endocannabinoides y la expresión de la conducta sexual masculina de la rata: papel del sistema mesolímbico dopaminérgico. CINVESTAV Sede Sur, Ciudad de México: Tesis Doctoral.
- Canseco-Alba et al. (2021). The nucleus accumbens dopamine increase typically triggered by sexual stimuli in male rats is no longer produced when animals are sexually inhibited due to sexual satiety. *Psychopharmacology* (submitted)
- Canseco-Alba, A., & Rodríguez-Manzo, G. (2019). Endocannabinoids interact with the dopaminergic system to increase sexual motivation: Lessons from the sexual satiety phenomenon. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13: 184.
- Carro-Juárez, M., Cervantes, E., Cervantes-Méndez, M., Rodríguez-Manzo, G. (2004). Aphrodisiac properties of *Montanoa tomentosa* aqueous crude extract in male rats. *Pharmacology Biochemistry Behavior*, 78: 129-34.
- Castro, D., & Bruchas, M. (2019). A motivational and neuropeptidergic hub: Anatomical and functional diversity within the nucleus accumbens shell. *Neuron*, 102: 529-552.
- Chang, K.T & Berg, D.K. (2001). Voltaged-gated channels block nicotinic regulation of creb phosphorylation and gene expression in neurons. *Neuron*, 32: 855-865.
- Changeux, J., Bertrand, D., Corringier, P., Dehaene, S., Edelstein, S., Lena, C., Le Novère N, Marubio L, Picciotto M, Zoli M. (1998). Brain nicotinic receptors: structure and regulation, role in learning and reinforcement. *Brain Research Brain Research Reviews*, 26: 198-216.
- Champtiaux, N., Han, Z.Y., Bessi, A., Rossi, F.M., Zoli, M., Marubio, L., McIntosh, J.M., Changeux, J.M. (2002) Distribution and Pharmacology of  $\alpha 6$ -Containing Nicotinic Acetylcholine Receptors Analyzed with Mutant Mice. *The Journal of Neuroscience*, 22: 1208-1217.
- Cofer, C. N. (1972). *Motivation and emotion*. Glenview, IL: Scott Foresman.
- Collins, A. L; Aitken, T.J; Greenfield, V.Y; Ostlund, S.B; Wassum, K.M. (2016) Nucleus accumbens acetylcholine receptors modulate dopamine and motivation. *Neuropsychopharmacology*, 41: 2830–2838.

- Collins, A., Aitken, T., Huang, I., Shieh, C., Greenfield, V., Monbouquette, H., Ostlund, S., Wassum, K. (2019). Nucleus Accumbens Cholinergic Interneurons Oppose Cue-Motivated Behavior. *Biological Psychiatry*, 86: 388-396.
- Colwill, R. M., & Rescorla, R. A. (1986). Associative structures in instrumental learning. In G. H. Bower (Ed.), *The psychology of learning and motivation* (pp. 55–104). New York: Academic Press.
- Corringer, P.J., Bertrand, S., Bohler, A., Edelstein, S.J., Changeux J.P., Bertrand, D. (1998). Critical éléments determining diversity in agonist binding and desensitization of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Neuroscience*, 18: 648-657.
- Covey, D.P. & Yocky, A.G. (2021). Endocannabinoid Modulation of Nucleus Accumbens Microcircuitry and Terminal Dopamine Release. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 23: 734975.
- Cox, M.E. & Parsons, S.J. (1997). Roles for protein kinase C and mitogen-activated protein kinase in nicotine-induced secretion from bovine adrenal chromaffin cells. *Journal of Neurochemistry*, 69: 1119-1130.
- Craig, W. (1918). Appetites and aversions as constituents of instincts. *Biological Bulletin*, 34, 91–107.
- Cragg, S.J. (2006). Meaningful silences: How dopamine listens to the ACh pause. *Trends in Neurosciences*, 29: 125–131.
- Dajas-Bailador, F. & Wonnacott, S. (2004). Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25: 317–324.
- Dani, J.A. (2001). Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. *Biological Psychiatry*, 49: 166–174.
- Dani, J.A. & Bertrand, D. (2007). Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47: 699–729.
- Dajas-Bailador, F; Mogg, A. J; Wonnacott, S. (2002). Intracellular Ca<sup>2+</sup> signals evoked by stimulation of nicotine acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells: contribution of voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channels and Ca<sup>2+</sup> stores. *Journal of Neurochemistry*, 81: 606-614.

Damsma, G., de Boer, P., Westerink, B., & Fibiger, H. (1990). Dopaminergic regulation of striatal cholinergic interneurons. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2015: 523-527.

de Boer, P., Damsma, G., Schram, Q., Stoof, J., Zaagsma, J., & Westerink, B. (1992). The effect of intrastriatal application of directly and indirectly acting dopamine agonists and antagonists on the in vivo release of acetylcholine measured by brain microdialysis. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 345: 144-152.

de Rover, M., Lodder, J., Kits, K., Schoffelmeer, A., & Brussaard, A. (2002). Cholinergic modulation of nucleus accumbens medium spiny neurons. *European Journal of Neuroscience*, 16: 2279-90.

Deng, P., Zhang, Y., Xu, Z.C. (2007). Involvement of I(h) in dopamine modulation of tonic firing in striatal cholinergic interneurons. *Journal of Neuroscience*. 27: 3148-56.

Di Chiara, G., Moreli, M., & Consolo, S. (1994). Modulatory functions of neurotransmitters in the striatum: ACh/dopamine/NMDA interactions. *Trends in Neuroscience*, 17: 228-233.

Exley, R & Cragg, S.J. (2008) Presynaptic nicotinic receptors: A dynamic and diverse cholinergic filter of striatal dopamine neurotransmission. *British Journal of Pharmacology* 153: S283–S297.

Fagen, Z., Mansvelder, H., Keath, J., & McGehee, D. (2003). Short and long-term modulation of synaptic inputs to brain reward areas by nicotine. *Annals of the NY Academy of Science*, 1003: 185-195.

Faure, P., Tolu, S., Valverde, S., Naudé, J. 2014. Role of nicotinic acetylcholine receptors in regulating dopamine neuron activity. *Neuroscience*, 282: 86-100.

Fennell, A., Pitts, E., Sexton, L., & Ferris, M. (2019). Phasic dopamine release magnitude tracks individual differences in sensitization of locomotor response following a history of nicotine exposure. *Scientific Reports*, 10: 173.

Fenster, C.P., Rains, M.F., Noerager, B., Quick, M.W., Lester, R.A. (1997). Influence of subunit composition on desensitization of neuronal acetylcholine receptors at low concentrations of nicotine. *Journal of Neuroscience*, 17: 5747–5759.

Fujii, S., Ji, Z., Sumikawa, K. (2000). Inactivation of alpha7 ACh receptors and activation of non-alpha7 ACh receptors both contribute to long term potentiation induction in the hippocampal CA1 region. *Neuroscience Letters*, 286: 134–138.

- Fiorino, D., Coury, A., & Philips, A. (1997). Dynamic changes in nucleus accumbens dopamine efflux during the Coolidge effect in male rats. *Journal of Neuroscience*, 17: 4849-4855.
- Floresco, S.B., West, A.R., Ash, B., Moore, H., Grace, A.A. (2003). Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nature Neuroscience*, 6: 968-973.
- Ford, C.P. (2014). The role of D2-Autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission. *Neuroscience*, 282: 13-22.
- Fresnoza, S.M., Batsikadze, G., Müller, L.E., Rost, C., Chamoun, M., Paulus, W., Kuo, M., Nitsche, M.A. (2021). Inhibitory effect of apomorphine on focal and nonfocal plasticity in the human motor cortex. *Pharmaceutics*, 13: 718-733.
- Fucile, S. (2004) Ca<sup>2+</sup> permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium*, 35: 1-8.
- Gefen, C., & Surmeier, D. (2011). Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annual Review of Neuroscience*, 34: 441-466.
- Ghosal, S., Sandi, C., & Van Der Kooij, M. (2019). Neuropharmacology of the mesolimbic system and associated circuits on social hierarchies. *Neuropharmacology*, 159: 2.
- Giuliano F & Allard J. (2001) Dopamine and male sexual function. *European Urology*, 40:601-8.
- Grace, A. (1991). Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience*, 49: 1-24.
- Grace, A., Floresco, S. B., Goto, Y., & Lodge, D. (2007). Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviours. *Trends in Neuroscience*, 30: 220-227.
- Gray, R; Rajan, A.S; Radcliffe, K.A; Yakehiro, M; Dani, J.A. (1996). Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature*, 383: 713-716.
- Graybiel, A.M. (1984). Neurochemically specified subsystems in the basal ganglia. *Ciba Foundation Symposium*, 107: 114 –149.
- Guadarrama-Bazante, I., Canseco-Alba, A. & Rodríguez-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.
- Guadarrama-Bazante, I., & Rodríguez-Manzo, G. (2019). Nucleus accumbens dopamine increases sexual motivation in sexually satiated male rats. *Psychopharmacology*, 236: 1-10.

Gueorguiev, V. D; Zeman, R. J; Meyer, E. M; Sabban, E.L. (2000). Involvement of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors in activation of tyrosine hydroxylase and dopamine  $\beta$ -hydroxylase gene expression in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*, 75: 1997-2005.

Heimer, L., Van Hoesen, G., Trimble, M., & Zahm, D. (2008). *The Anatomy of the Basal Forebrain*. In: G. V. L. Heimer, *Anatomy of Neuropsychiatry* (pp. 27-67). St. Louis, Missouri: Elsevier.

Hernández-González, O., Mondragón-García, A., Hernández-López, S., Castillo-Rolon, D.E., Arenas-López, G., Tapia, D. & Mihailescu, S. (2020). Mechanisms of stimulatory effects of mecamylamine on the dorsal raphe neurons. *Brain Research Bulletin*, 164:289-298.

Hnasko, T., Hjelmstad, G., Fields, H., & Edwards, R. (2012). Ventral tegmental area glutamate neurons: electrophysiological properties and projections. *Journal of Neuroscience*, 32: 15076-15085.

Hoebel, B., Avena, N., & Rada, P. (2007). Accumbens dopamine-acetylcholine balance in approach and avoidance. *Current Opinion in Pharmacology*, 7: 617-627.

Hull, C. L. (1943). *Principles of behavior*. New York: Appleton-Century-Crofts.

Hull, E., & Rodríguez-Manzo, G. (2017). Male Sexual Behavior. In: M. J. D.W Pfaff, *Hormones, Brain and Behavior*, 3rd Edition (pp. 1-57). Oxford: Academic Press/Elsevier.

Joshua, M; Adler, A; Mitelman, R; Vaadia, E; Bergman, H. (2008) Midbrain dopaminergic neurons and striatal cholinergic interneurons encode the difference between reward and aversive events at different epochs of probabilistic classical conditioning trials. *Journal of Neuroscience*, 28: 11673–11684.

Karlin, A. (1993). Structure of nicotine acetylcholine receptors. *Current Opinion in Neurobiology*, 3: 299-309.

Karlin, A. (2002). Ion channel's structure: Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, 3: 102-114.

Katz, B. & Thesleff, S. (1957). A study of desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate. *Journal of Physiology-London*, 138: 63-80.

Kenny, P.J., File, S.E., Neal, M.J. (2000). Evidence for a complex influence of nicotinic acetylcholine receptors on hippocampal serotonin release. *Journal of Neurochemistry*, 75: 2409–2414.

- Kravitz, A., Tye, L., Kreitzer, A. (2012). Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. *Nature Neuroscience*, 15: 816–818.
- Kulak, J.M; McIntosh, J.M; Yoshikami, D; Olivera, B.M. (2001). Nicotine-evoked transmitter release from synaptosomes: functional association of specific presynaptic acetylcholine receptors and voltage-gated calcium channels. *Journal of neurochemistry*, 77:1581-1589.
- Lammel, S., Lim, B. K., & Malenka, R. C. (2014). Reward and aversion in a heterogeneous midbrain dopamine system. *Neuropharmacology*, 76: 1-21.
- Laviolette, S.R. & van der Kooy, D. (2004). The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behavior. *Nature Reviews Neuroscience*, 5: 55-65.
- Lee, I.H; Seitz, A.R, Assad, J.A. (2006) Activity of tonically active neurons in the monkey putamen during initiation and withholding of movement. *Journal of Neurophysiology*, 95: 2391–2403.
- Lee, J.H., Riberiro, E.A., Kim, J., Ko, B., Kronman, H., Jeong, Y.H., Kim, J.K., Janak, P.H., Nestler, E.J., Koo, J.W., Kim, J. (2020). Dopaminergic Regulation of Nucleus Accumbens Cholinergic Interneurons Demarcates Susceptibility to Cocaine Addiction. *Biological Psychiatry*, 88: 746-757.
- Levin, E. D. & Caldwell, D. P. (2006). Low-dose mecamylamine improves learning of rats in the radial-arm maze repeated acquisition procedure. *Neurobiology of Learning and Memory*, 86(1): 117–122.
- Lim, S. A., Kang, U. J., & McGehee, D. S. (2014). Striatal cholinergic interneuron regulation and circuit effects. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 6: 22.
- Lippiello, P.M.M Sears, S.B., Fernandes, K.G. (1987). Kinetics and mechanism of L-[<sup>3</sup>H] nicotine binding to putative high affinity receptor sites in rat brain. *Molecular Pharmacology*, 31: 392-400.
- Liss, B., & Roeper, J. (2010). Ion channels and regulation of dopamine neuron activity. *Dopamine Handbook*. New York, Oxford University Press.
- Mansvelder, H.D & McGehee, D.S. (2002). Synaptic mechanisms underline nicotine-induced excitability of brain reward areas. *Neuron*, 33: 905-919.
- Marchi, M., Grilli, M., Pittaluga, A.M. (2015). Nicotinic modulation of glutamate receptor function at nerve terminal level: a fine-tuning of synaptic signals. *Frontiers in Pharmacology*, 6: 1-10.

Marchi, M., Risso, F., Viola, C., Cavazzani, P., & Raiteri, M. (2002). Direct evidence that release-stimulating  $\alpha 7$  nicotinic cholinergic receptors are localized on human and rat brain glutamatergic axon terminals. *Journal of Neurochemistry*, 80: 1071-1078.

Mark, G., Blader, D., & Hoebel, B. (1991). A conditioned stimulus decreases extracellular dopamine in the nucleus accumbens after the development of a learned taste aversion. *Brain Research*, 551: 308-310.

Mark, G.; Rada, P; Pothos, E; Hoebel, B.G. (1992) Effects of feeding and drinking on acetylcholine release in the nucleus accumbens, striatum, and hippocampus of freely behaving rats. *Journal of Neurochemistry*, 58: 2269–2274.

Mark, G., Rada, P., Weinberg, J., & Hoebel, B. (1995). Extracellular acetylcholine is increased in the nucleus accumbens following the presentation of an adversity conditioned taste stimulus. *Brain Research*, 688: 184-188.

Mark, G., Shabani, S., Dobbs, L., & Hansen, S. (2011). Cholinergic modulation of mesolimbic dopamine function and reward. *Physiology and Behavior*, 104: 76-81.

Mas, M., Gonzalez-Mora, J., Louilot, A., Sole, C., & Guadalupe, T. (1990). Increased dopamine release in the nucleus accumbens of copulating male rats as evidence by in vivo voltammetry. *Neuroscience Letters*, 110: 303-308.

Maurice, N., Mercer, J., Chan, C. S., Hernandez-Lopez, S., Held, J., Tkatch, T., Surmeier, D.J. (2004). D2 Dopamine Receptor-Mediated Modulation of Voltage-Dependent  $\text{Na}^+$  Channels Reduces Autonomous Activity in Striatal Cholinergic Interneurons. *Journal of Neuroscience*, 24: 10289-10301.

Mesulam, M., Mufson, E., Wainer, B., & Levey, A. (1983). Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience*, 10: 1185-1201.

Mifsud, J., Hernandez, L., & Hoebel, B. (1989). Nicotine infused into the nucleus accumbens increases synaptic dopamine as measured by in vivo microdialysis. *Brain Research*, 478: 365-367.

Mingote, S., Amsellem, A., Kempf, A., Rayport, S., & Chuhma, N. (2019). Dopamine-glutamate neuron projections to the nucleus accumbens medial shell and behavioral switching. *Neurochemistry International*, 129: 2-10.

- Mogenson, G., Jones, D., & Yim, C. (1980). From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Progress in Neurobiology*, 14: 69-97.
- Morales, M. & Margolis, E. B. (2017). Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, 18: 73–85.
- Morris, G; Arkadir, D; Nevet, A; Vaadia, E; Bergman, H. (2004) Coincident but distinct messages of midbrain dopamine and striatal tonically active neurons. *Neuron*, 43: 133–143.
- Nai, Q; Mcintosh, M; Margiotta, J. (2003). Relating neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes defined by subunit composition and channel function. *Molecular Pharmacology*, 63:311-324.
- Nakayama, H; Numakawa, T; Ikeuchi, T; Hatanaka, H. (2001). Nicotine-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase and CREB in PC12h cells. *Journal of Neurochemistry*, 79: 489-498.
- Newman, E., Climer, J., Gupta, K., & Hasselmo, M. (2012). Cholinergic modulation of cognitive processing: Insights drawn from computational models. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6: 1-19.
- Nolan, S., Zachry, J., Johnson, A., Brady, L., Siciliano, C., & Calipari, E. (2020). Direct dopamine terminal regulation by local striatal microcircuitry. *Journal of Neurochemistry*, in press.
- Nougaret, S & Ravel, S. (2015) Modulation of tonically active neurons of the monkey striatum by events carrying different force and reward information. *Journal of Neuroscience*, 35: 15214–15226.
- Oldenburg, I.A. & Ding, J.B. (2011). Cholinergic modulation of synaptic integration and dendritic excitability in the striatum. *Current Opinion in Neurobiology*, 21:425– 432.
- Ozturk Fincan, G.S., Vural, I.M., Ercan, Z.S., Sarioglu, Y. (2010). Enhancement effects of nicotine on neurogenic relaxation responses in the corpus cavernosum in rabbits: The role of nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *European Journal of Pharmacology*, 627: 281-284.
- Pakhotin, P. & Bracci, E. (2007) Cholinergic interneurons control the excitatory input to the striatum. *Journal of Neuroscience*, 27: 391–400.
- Paladini, C., & Roeper, J. (2014). Generating bursts (and pauses) in the dopamine midbrain neurons. *Neuroscience*, 282: 109-121.

- Palmiter, R. (2008). Dopamine signaling in the dorsal striatum is essential for motivated behaviors: lessons from dopamine-deficient mice. *Annals of the NY Academy of Science*, 1129: 35-46.
- Parkes, S., Bradfield, L., & Balleine, B. (2015). Interaction of insular cortex and ventral striatum mediates the effect of incentive memory on choice between goal-directed actions. *Journal of Neuroscience*, 35: 6464-6471.
- Pfaus, J., Damsma, G., Nomikos, G., Wenkstern, D., Blaha, C., Philips, A., & Fibiger, H. (1990). Sexual behavior enhances central dopamine transmission in the male rat. *Brain Research*, 530: 345-348.
- Picciotto, M., Caldarone, B., King, S., & Zachariou, V. (2000). Nicotinic receptors in the brain: Links between molecular biology and behavior. *Neuropsychopharmacology*, 22: 451-465.
- Picciotto, M., Higley, M., & Mineur, Y. (2012). Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron*, 76: 116-129.
- Picciotto, M., Zoli, M., Rimondini, R., Lena, C., Marubio, L., Pich, E., & Changeux, J. (1998). Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in reinforcing properties of nicotine. *Nature*, 391: 173-177.
- Pidoplichko, V., DeBiasi, M., Williams, J., & Dani, J. (1997). Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature*, 390: 401-404.
- Pidoplichko, V., Noguchi, J., Areola, O.O., Liang, Y., Peterson, J., Zhang, T., Dani, J.A. (2004). Nicotinic cholinergic synaptic mechanisms in the ventral tegmental area contribute to nicotine addiction. *Learning & Memory*, 11: 60-9.
- Pignatelli, M., & Bonci, A. (2015). Role of dopamine neurons in reward and aversion: A synaptic plasticity perspective. *Neuron*, 86: 1145-1157.
- Pleim ET, Matochik JA, Barfield RJ, Auerbach SB. (1990). Correlation of dopamine release in the nucleus accumbens with masculine sexual behavior in rats. *Brain Res* 524:160-3. doi: 10.1016/0006-8993(90)90507-8
- Quick, M. & Lester, A.J. (2002). Desensitization of Neuronal Nicotinic Receptors. *Journal of Neurobiology*, 53: 457-78.

- Quirk, M., Bordia, T., & O'Leary, K. (2007). Nicotinic receptors as CNS targets for Parkinson's disease. *Biochemical Pharmacology*, 74: 1224-1234.
- Rada, P., Mark, G., Yeomans, J., & Hoebel, B. (2000). Acetylcholine release in ventral tegmental area by hypothalamic self-stimulation, eating, and drinking. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 65: 375-379.
- Rathouz, M. M & Berg, D.K. (1994) Synaptic-type acetylcholine receptors raise intracellular calcium levels in neurons by two mechanisms. *Journal of Neuroscience*, 14 (6935-6945).
- Rice, M., & Craigg, S. (2004). Nicotine amplifies reward-related dopamine signals in striatum. *Nature Neuroscience*, 7: 583-584.
- Retana-Marquez, S., Dominguez-Salazar, E., Velazquez-Moctezuma, J. (1993). Muscarinic and nicotinic influences on masculine sexual behavior in rats: Effects of oxotremorine, scopolamine, and nicotine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 44: 913-917.
- Rodriguez-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., & Fernández-Guasti, A. (1994). Reversal of sexual exhaustion by serotonergic and noradrenergic agents. *Behavioral Brain Research*, 62: 127-134.
- Rodríguez-Manzo, G., Guadarrama-Bazante, I., & Morales-Calderón, M. (2011). Recovery from sexual exhaustion-induced copulatory inhibition and drug hypersensitivity follow a same time course: two expressions of a same process? *Behavioral Brain Research*, 217: 253-260.
- Role, L.W & Berg, D.K. (1996). Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron*, 16: 1077-1085.
- Saenz de Tejada, I. (2002). Molecular mechanisms for the regulation of penile smooth muscle contractility. *International Journal of Impotence Research*, 14: S6-S10.
- Salamone, J. D. (1991). Behavioral pharmacology of dopamine systems: A new synthesis. In P. Willner & J. Scheel Kruger (Eds.), *The mesolimbic dopamine system: From motivation to action* (pp. 599–613). Cambridge, England: Cambridge University Press.

- Salamone, J. D. (1992). Complex motor and sensorimotor functions of striatal and accumbens dopamine: Involvement in instrumental behavior processes. *Psychopharmacology*, 107, 160–174.
- Salamone, J. D. (2010). Motor function and motivation. In G. F. Koob, M. LeMoal, & R. F. Thompson (Eds.), vol. 3. *Encyclopedia of behavioral neuroscience* (pp. 267–272). Oxford: Academic Press.
- Salamone, J. D., & Correa, M. (2017a). Neurobiology of effort and the role of mesolimbic dopamine. In S. Kim, J. Reeve, & M. Bong (Eds.), *Advances in motivation and achievement* vol. 19. *Recent developments in neuroscience research on human motivation* (pp. 229–256).
- Salamone, J. D., & Correa, M. (2017b). Motor function and motivation. In *Reference module in neuroscience and biobehavioral psychology*. Elsevier.
- Salamone, J. D., & Correa, M. (2018). Parsing the Role of Mesolimbic Dopamine in Specific Aspects of Motivation: Behavioral Activation, Invigoration, and Effort-Based Decision Making. *Advances in Motivation Science*, 129–167.
- Salminen, O., Murphy, K., McIntoch, J., Drago, J., Marks, M., Collins, A., & Grady, S. (2004). Subunit composition and pharmacology of two classes of striatal presynaptic nicotinic acetylcholine receptors mediating dopamine release in mice. *Molecular Pharmacology*, 65: 1526-1535.
- Serafini, R., Pryce, K., & Zachariou, V. (2020). The mesolimbic dopamine system in chronic pain and associated affective comorbidities. *Biological Psychiatry*, 87: 64-73.
- Schoepfer, R., Whiting, P., Esch, F., Blacher, R., Shimasaki, S., Lindstrom, J. (1988). cDNA clones coding for the structural subunit of a chicken brain nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron*, 1: 241-8.
- Schopenhauer, W. (1999). *Prize essay on the freedom of the will*. Cambridge texts in the history of philosophy. Zoller, G. Ed. Payne, EFJ (Trans.). Cambridge, England: Cambridge University Press.
- Schultz, W. (2001). Reward signaling by dopamine neurons. *Neuroscientist*, 7: 293-302.
- Schulz, J.M. & Reynolds, J.N. (2013). Pause and rebound: sensory control of cholinergic signaling in the striatum. *Trends in Neuroscience*, 36: 41-50.

Siciliano, C., McIntosh, J., Jones, S., & Ferris, M. (2017).  $\alpha 2\beta 2$  Subunit containing nicotinic acetylcholine receptors exert opposing actions on rapid dopamine signaling in the nucleus accumbens of rats with high-versus low-response to novelty. *Neuropharmacology*, 126: 281-291.

Skinner, B. F. (1953). *Science and human behavior*. New York: Simon & Schuster.

Smith, A.D, & Bolam, J. (1990). The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurons. *Trends in Neuroscience*, 13: 259-265.

Soulairac, M.L. & Soulairac, A. (1975). Monoaminergic and cholinergic control of sexual behavior in the male rat. In: Sandler, M; Gessa, G.L., eds. *Sexual Behavior: Pharmacology and Biochemistry*. New York: Raven Press: 99-116.

Spence, K. W. (1956). *Behavior theory and conditioning*. New Haven: Yale University Press.

Stadler, H., Lloyd, K., Gadea-Ciria, M., & Bartholini, G. (1973). Enhanced striatal acetylcholine release by chlorpromazine and its reversal by apomorphine. *Brain Research*, 55: 476-480.

Steffensen, S., Svingos, A., Pickel, V., & Henriksen, S. (1998). Electrophysiological characterization of GABAergic neurons in the ventral tegmental area. *Journal of Neuroscience*, 18: 8003-8015.

Stoof, J., de Boer, T., Sminia, P., & Mulder, A. (1982). Stimulation of D2-dopamine receptors in rat neostriatum inhibits the release of acetylcholine and dopamine but does not affect the release of gamma-aminobutyric acid, glutamate or serotonin. *European Journal of Pharmacology*, 84: 211-4.

Straub, C., Trisch, N.X., Hagan, N.A., Gu, C., Sabatini, B.L. (2014). Multiphasic modulation of cholinergic interneurons by nigrostriatal afferents. *Journal of Neuroscience*, 34: 8557-8569.

Tan, K., Yvon, C., Turiault, M., Mirzabekov, J., Doehner, J., Labouebe, G., Deisseroth, K., Tye, K.M., Lüscher, C. (2012). GABA neurons of the VTA drive conditioned place aversion. *Neuron*, 73: 1173-1183.

Tedford, C., Crosby, G., Iorio, L., & Chipkin, R. (1992). Effect of SCH 39166, a novel dopamine D1 receptor antagonist, on acetylcholine release in rat striatal slices. *European Journal of Pharmacology*, 211: 169-176.

Terry, A.V. Jr & Clarke, M.S. (1994). Nicotine stimulation of nerve growth factor receptor expression. *Life Sciences*, 55: 91–98.

- Terry, A.V. Jr., Buccafusco, J.J., Prendergast, M.A. (1999). Dose-specific improvements in memory-related task performance by rats and aged monkeys administered the nicotinic-cholinergic antagonist mecamylamine. *Drug Development Research*, 47: 127–136.
- Threlfell, S & Cragg, S.J. (2011) Dopamine signaling in dorsal versus ventral striatum: The dynamic role of cholinergic interneurons. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5: 11.
- Threlfell, S., Lalic, T., Platt, N.J., Jennings, K.A., Deisseroth, K., Cragg, S.J. (2012). Striatal dopamine release is triggered by synchronized activity in cholinergic interneurons. *Neuron*, 75 : 58-64.
- Tyagi, C., Chauhan, N., Tripathi, A., Jain, U., & Avasthi, D. (2019). Voltametric measurements of neurotransmitter-acetylcholine through metallic nanoparticles embedded 2-D material. *International Journal of Biological Macromolecules*, 140: 415-422.
- van Zessen, R., Philips, J., Budygin, E. & Stuber, G. (2012). Activation of VTA GABA neurons disrupts reward consumption. *Neuron*, 73: 1184-1194.
- Volkow, N., Wise, R. & Baler, R. (2017). The dopamine motive system: implications for drug and food addiction. *Neuroscience*, 18: 741-752.
- Wang, Z., Kai, L., Day, M., Ronesi, J., Yin, H.H., Ding, J., Tkatch, T., Lovinger, D.M., Surmeier, D.J. (2006). Dopaminergic control of corticostriatal long-term synaptic depression in medium spiny neurons is mediated by cholinergic interneurons. *Neuron*, 50: 443– 452.
- Wess, J. (2003). Novel insights into muscarinic acetylcholine receptor function using gene targeting technology. *Trends in Pharmacology*, 24: 414-420.
- Witten, I. B., Lin, S. C., Brodsky, M., Prakash, R., Diester, I., Anikeeva, P., Gradinaru, V., Ramakrishnan, C., & Deisseroth, K. (2010). Cholinergic interneurons control local circuit activity and cocaine conditioning. *Science*, 330: 1677–1681.
- Whiting, P.J., Esch, F., Shimasaki, S., and Lindstrom, J. (1987a). Neuronal nicotinic acetylcholine receptor b-subunit is coded for by the cDNA clone a4. *FEBS Letters*, 219: 459-463.
- Whiting, P.J., Liu, R., Morley, B.J., and Lindstrom, J.M. (1987b). Structurally different neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes purified and characterized using monoclonal antibodies. *Journal of Neuroscience*, 7: 4005–4016.

- Whiting, P.J., Schoepfer, R., Lindstrom, J., and Priestley, T. (1991). Structural and pharmacological characterization of the major brain nicotinic acetylcholine receptor subtype stably expressed in mouse fibroblasts. *Molecular Pharmacology*, 40: 463–472.
- Wise, R. (2004). Dopamine, learning and motivation. *Nature Review Neuroscience*, 5: 483-494.
- Wonnacott, S. (1987). Brain nicotine binding sites. *Human Toxicology*, 6: 343–353.
- Wonnacott, S. (1997). Presynaptic nicotinic Ach receptors. *Trends in Neurosciences*, 20: 92-98.
- Yamodo, I.H, Chiara, D.C., Cohen, J.B., Miller, K.W. (2010). Conformational Changes in the Nicotinic Acetylcholine Receptor during Gating and Desensitization. *Biochemistry*, 49: 156–165.
- Yan, Y., Peng, C., Arvin, M.C., Jin, X., Kim, V.J., Ramsey, M.D., Wang, Y., Banala, S., Wokosin, D.L., McIntosh, J.M., Lavis, L.D., Drenan, R.M. (2018). Nicotinic Cholinergic Receptors in VTA Glutamate Neurons Modulate Excitatory Transmission. *Cell Reports*, 23: 2236-2244.
- Yang, J; McBride, S; Mak, D. D; Vardi, N; Palczewski, K; Haeseleer, F; Foskett, J.K. (2002). Identification of a family of calcium sensors as protein ligands of inositol triphosphate receptor Ca<sup>2+</sup> release channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 99: 7711-7716.
- Yin, R. & French E.D. (2000). A comparison of the effects of nicotine on dopamine and non-dopamine neurons in the rat ventral tegmental area: an in vitro electrophysiological study. *Brain Research Bulletin*, 51: 507-514.
- Young, P. T. (1961). *Motivation and emotion*. New York: John Wiley & Sons.
- Zaborsky, L. (2002). The modular organization of brain systems. Basal forebrain: The last frontier. *Progress in Brain Research*, 136: 359-372.
- Zhang, H. & Sulzer, D. (2004). Frequency-dependent modulation of dopamine release by nicotine. *Nature Neuroscience*, 7: 581-582.
- Zhang, L; Doyon, W.M; Clark, J.J; Phillips, P.E; Dani, J.A. (2009) Controls of tonic and phasic dopamine transmission in the dorsal and ventral striatum. *Molecular Pharmacology*, 76: 396–404.
- Zhou F. M; Wilson C.J; Dani, J.A. (2002). Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. *Journal of Neurobiology*, 53:590–605.
- Zhou, F.M; Liang, Y; Dani, J.A. (2001) Endogenous nicotinic cholinergic activity regulates dopamine release in the striatum. *Nature Neuroscience*, 4: 1224–1229.

## Anexo 1

Efecto de la combinación de dosis sub-efectivas del antagonista de nAChR mecamilamina, y del antagonista de receptores NMDA ketamina, sobre la cópula de ratas sexualmente saciadas

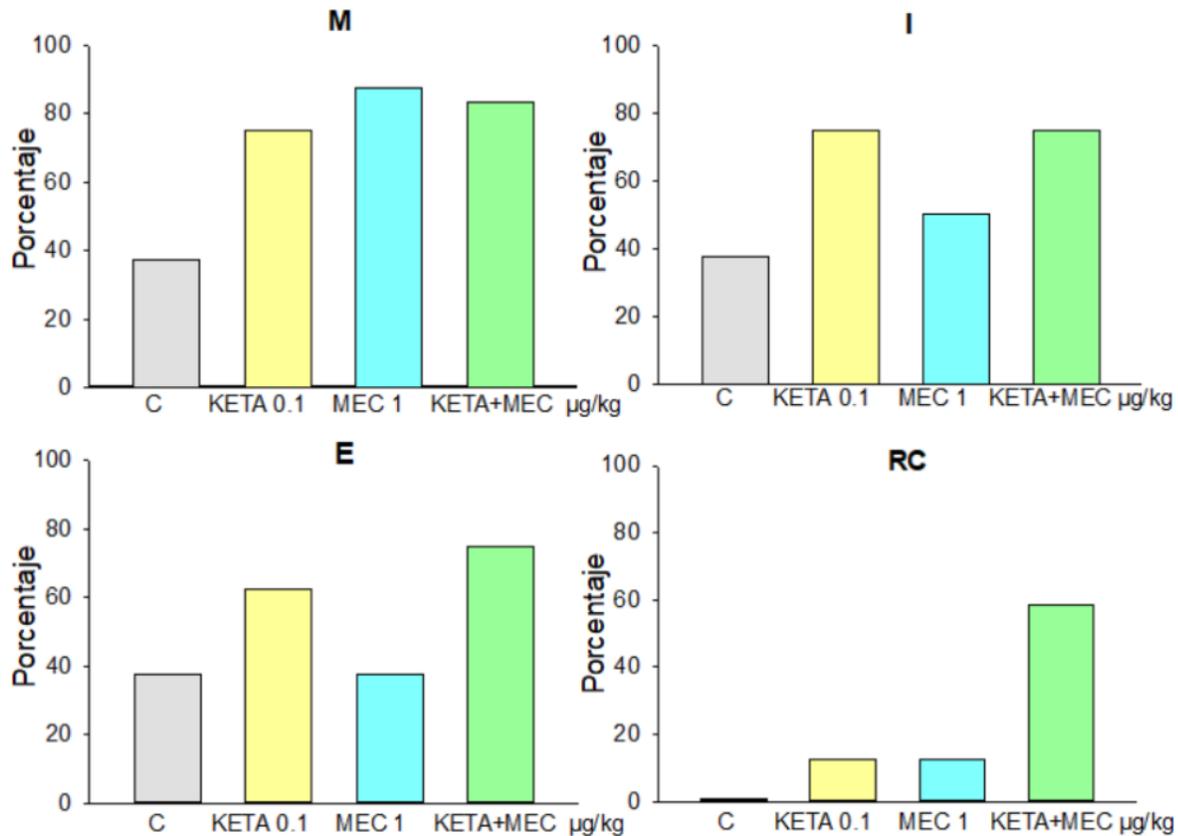


Figura 8. Porcentaje de machos sexualmente saciados que presenta las respuestas de monta (M), intromisión (I), eyacuación (E) y que reinicia la cópula después de la eyacuación (RC), en respuesta a la administración i.p. de dosis sub-efectivas de mecamilamina (1.0 µg/kg, n=8) y de ketamina (0.1 µg/kg n=8), de su combinación (n=12), o sus vehículos (agua bidestilada) como control (C) (n=8), a las 24h post-saciedad. Prueba F de Fisher n.s.

Como se puede observar en la figura 8, la combinación de dosis sub-efectivas de ketamina (0.1 µg/kg) y mecamilamina (1 µg/kg) produjo una clara tendencia a aumentar la proporción de ratas sexualmente saciadas que reinició la cópula después de eyacular, pero que no alcanzó significancia estadística en comparación con el grupo control. Por lo tanto, dicha combinación no revirtió la inhibición sexual de las ratas saciadas.

Efecto de la combinación de dosis sub-efectivas del antagonista de nAChR, mecamilamina, y del antagonista de receptores GABA<sub>A</sub> bicuculina, sobre la cópula de ratas sexualmente saciadas

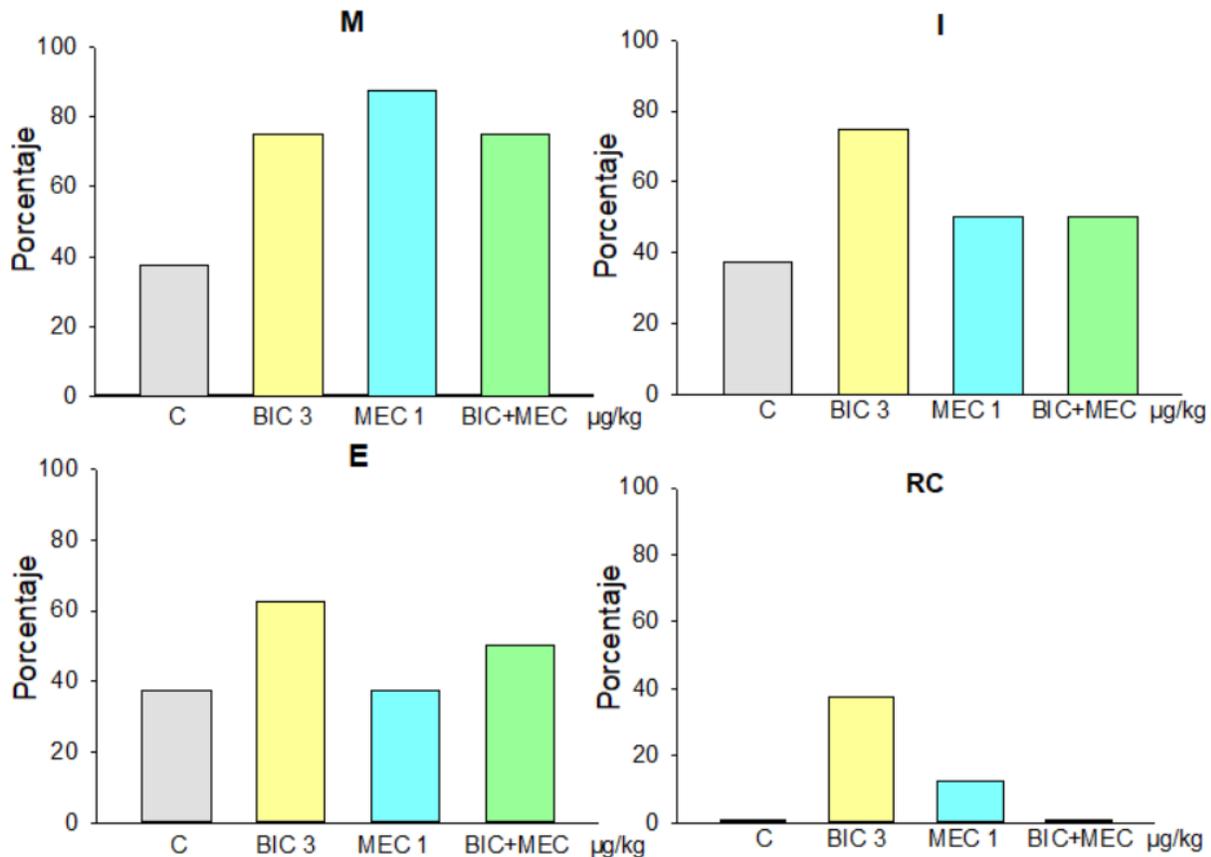


Figura 9. Porcentaje de machos sexualmente saciados que presenta las respuestas de monta (M), intromisión (I), eyacuación (E) y que reinicia la cópula después de la eyacuación (RC), en respuesta a la administración i.p. de dosis sub-efectivas de mecamilamina (1.0 µg/kg, n=8), de bicuculina (3 µg/kg, n=8) y de su combinación (n=8) o de sus vehículos (agua bidestilada) como control (C) (n=8), a las 24h post-saciedad. Prueba F de Fisher n.s.

La figura 9 muestra que la combinación de dosis sub-efectivas de bicuculina y mecamilamina no modificó la proporción de animales que presentó las diferentes respuestas sexuales en comparación con el grupo control. En particular, con este tratamiento combinado ninguno de los animales sexualmente saciados reinició la cópula después de la eyacuación.