



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

**Sede sur**

**Departamento de Farmacobiología**

**“Evaluación de la participación de la transmisión GABAérgica en la  
reversión de la saciedad sexual inducida por los endocannabinoides  
AEA y 2-AG”**

**T E S I S**

Que presenta:

**LUIS ENRIQUE ORDOÑEZ MEJIA**

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE NEUROFARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA  
EXPERIMENTAL**

**Directora:**

Dra. Gabriela Rodríguez Manzo

Ciudad de México

AGOSTO, 2022

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

**Para la realización de este trabajo de tesis se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca de maestría No. 718561, CVU 933341 para estudios a nivel nacional.**

## **DEDICATORIA**

A mis padres

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a la Dra. Gabriela Rodríguez Manzo, por haber confiado en mi para llevar a cabo este trabajo de investigación en su laboratorio, por enriquecer este trabajo con su experiencia y conocimiento, por apoyarme en el proceso de análisis siempre estimulando mi propio criterio como investigador y teniendo paciencia cuando se trataba de aclararme dudas. Muchas gracias.

A mis sinodales, el Dr. Alonso Fernández Guasti y la Dra. Ana Gisela Canseco Alba, les agradezco por las aportaciones que realizaron para el buen desarrollo y término de esta investigación, por el apoyo que me brindaron y porque sin duda sus conocimientos forman parte de la columna vertebral de este proyecto.

Gracias a la C. Ma. De los Ángeles Ceja Gálvez, por su apoyo técnico en el desarrollo de los experimentos, así como su paciencia al enseñarme y darme sus consejos.

Gracias al Dr. René Garduño Gutiérrez, por su apoyo teórico y práctico, así como sus enseñanzas ya que sin duda aportaron a mi trabajo dentro del laboratorio y fuera de este.

Gracias a la M. en C. Valeria Soriente Soria y a la Dra. Estefanía González Morales por sus consejos y sus enseñanzas teórico-prácticas, ya que aportaron a mi mejor desempeño en el posgrado y por su apoyo en determinados momentos complicados para mí.

Agradezco a mis compañeras de maestría, Ana e Itzel, por apoyarme a lo largo de este proyecto, formamos un gran equipo para cumplir nuestros objetivos.

Un agradecimiento especial a todos los investigadores de CINVESTAV sede sur que participaron en mi curso de maestría. Su pasión por la investigación en cada una de sus áreas sin duda impulsó mi motivación y curiosidad por siempre buscar la verdad a través de la ciencia.

Gracias Abril, mi compañera de vida, gracias por estar en los mejores y en los peores momentos, por tenerme paciencia a lo largo de mi formación en el posgrado. Eres sin duda, parte de este logro.

Le agradezco a mi familia, la familia Mote Ordoñez, la familia Cruz Navarro y a mis amigos, esos hermanos que la vida me dio, por todo el apoyo brindado y por siempre estar.

Un gran logro en mi vida, una pequeña aportación al saber universal, el mayor agradecimiento va para aquellos que se me adelantaron, mis padres, Juvencio Ordóñez López y Enriqueta Mejía y Martínez. Sin ellos no estaría aquí y sin su formación no hubiera podido concluir este proyecto. Gracias infinitas, se que estuvieron conmigo en cada paso de este camino.

<b>Índice</b>	
<b>Glosario</b> .....	vi
<b>Resumen</b> .....	viii
<b>Abstract</b> .....	ix
<b>Introducción</b> .....	1
1. Conducta Sexual Masculina.....	1
2. Saciedad Sexual .....	3
3. Circuito Mesolímbico Dopaminérgico (MSL) .....	4
3.1. Relación del MSL con la conducta sexual masculina.....	6
4. Sistema Endocannabinoide .....	7
4.1. Endocannabinoides.....	7
4.2. Receptores a cannabinoides .....	9
5. Papel de los endocannabinoides en el MSL .....	10
6. Transmisión GABAérgica y circuito MSL .....	10
7. Transmisión GABAérgica y conducta sexual de la rata macho .....	15
<b>Antecedentes directos</b> .....	16
<b>Planteamiento del problema</b> .....	17
<b>Hipótesis</b> .....	18
<b>Objetivos generales</b> .....	18
<b>Objetivos específicos</b> .....	18
<b>Material y Métodos</b> .....	19
<b>Resultados</b> .....	23
<b>Discusión</b> .....	32
<b>Conclusiones</b> .....	42
<b>Perspectivas</b> .....	42
<b>Bibliografía</b> .....	44

## **Glosario**

$\Delta^9$ -THC: Tetrahidrocannabinol

(+)-3-PPP: n-N-propil-3-(3-hidroxifenil) piperidina

2-AG: 2-Araquidonoilglicerol

AEA: Araquidonoiletanolamida

APOM: Área Preóptica Media

AMPC: Adenosín Monofosfato cíclico

ATV: Área tegmental ventral

AMT: Transportador membranal de Anandamida

AMPA: Ácido amino-3-hidroxi-4-metil-4-isoxazolpropiónico

CIN: Interneurona Colinérgica

CB1R: Receptor cannabinoide subtipo 1

CB2R: Receptor cannabinoide subtipo 2

CHPG: 2-cloro-5-hidroxifenilglicina

COX-2: Ciclooxygenasa-2

DA: Dopamina

D1-Like: Receptores de dopamina tipo 1

D2-Like: Receptores de dopamina tipo 2

D2: Receptor dopaminérgico subtipo 2

DGL: Diacilglicerol lipasa

DSI: Supresión de la inhibición inducida por despolarización

DSE: Supresión de la excitación inducida por despolarización

FSI: Interneuronas de disparo rápido

GABA: Ácido  $\gamma$ -aminobutírico

GABA<sub>A</sub>: Receptor de GABA subtipo A

GABA<sub>B</sub>: Receptor de GABA subtipo B

GABA<sub>C</sub>: Receptor de GABA subtipo C

GAD: Glutamato descarboxilasa

GAT: Transportador de GABA

G<sub>i</sub>: Proteína G inhibitoria

G<sub>s</sub>: Proteína G estimulante

GPCR: Receptor unido a proteína G  
L-DOPA: Levodopa  
LTSI: Interneuronas de bajo umbral de disparo  
MAGL: Monoacilglicerol lipasa  
MGluR5: Receptor metabotrópico 5 de glutamato  
MSL: Sistema mesolímbico  
MSN: Neuronas Espinosas Medias  
NAcc: Núcleo Accumbens  
NAPE: Araquidonoilfosfatidiletanolamina  
NMDA: N-metil-D-aspartato  
oEPSC: Corrientes postsinápticas excitatorias inducidas ópticamente  
PLC- $\beta$ : Fosfolipasa C Beta  
PLD: Fosfolipasa D  
SNC: Sistema Nervioso Central  
TRPV1: Receptor de potencial transitorio vanilloide 1  
VGAT: Transportador vesicular de GABA  
VFT: Trampa de Venus Atrapamoscas

## Resumen

El sistema mesolímbico dopaminérgico (MSL), que se compone de células dopaminérgicas originadas en el área tegmental ventral (ATV) que proyectan al núcleo accumbens, juega un papel central en el desarrollo y mantenimiento de la saciedad sexual. La actividad de estas neuronas es modulada por influencias GABAérgicas y glutamatérgicas en el ATV. La administración sistémica e intra-ATV del antagonista de receptores GABA<sub>A</sub>, bicuculina, y del endocannabinoide (eCB) anandamida (AEA), y la administración sistémica del eCB 2-araquidonoilglicerol (2-AG), revierten por sí mismos la inhibición sexual de machos sexualmente saciados. Ambos eCBs interactúan con la transmisión glutamatérgica para revertir la saciedad sexual. En esta investigación se buscó establecer el papel de los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> en las acciones del GABA para mantener la inhibición sexual de animales saciados y su posible interacción con AEA y 2-AG para revertir la saciedad sexual. Para ello, se administraron por vía sistémica, diferentes dosis del agonista de receptores GABA<sub>B</sub> baclofen, a ratas sexualmente saciadas. Por otro lado, a grupos independientes de machos sexualmente saciados se les administró una combinación de dosis sub-efectivas de los eCBs con dosis sub-efectivas de baclofen o bicuculina, para determinar si sus efectos se sumaban para revertir la saciedad sexual. Los resultados indican que baclofen no revierte la saciedad sexual y que los efectos de los tratamientos de AEA con bicuculina o con baclofen, no se sumaron para revertir la saciedad sexual. El 2-AG canceló los efectos facilitadores de dosis sub-efectivas y efectivas de bicuculina y, combinado con baclofen, mostró una clara tendencia a revertir la saciedad que no alcanzó significancia estadística. Se concluye que: a) AEA no interactúa con la transmisión GABAérgica para revertir la saciedad sexual; b) 2-AG bloquea los efectos facilitadores de bicuculina sobre la cópula, pero favorece los de baclofen en ratas sexualmente saciadas; c) los receptores GABA<sub>B</sub> no participan en los efectos del GABA para mantener la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas y d) AEA y 2-AG parecen actuar por mecanismos diferentes para revertir la saciedad sexual.

## **Abstract**

The mesolimbic dopaminergic system, composed by dopaminergic neurons whose cell bodies originate in the ventral tegmental area (VTA) and project to the nucleus accumbens, plays an important role in the development and maintenance of the sexual satiety phenomenon. Dopaminergic neuron's activity is modulated by GABAergic and glutamatergic transmission at the VTA. Systemic and intra-VTA administration of the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist bicuculline and the endocannabinoid (eCB) anandamide (AEA), and the systemic administration of the eCB 2-arachidonoylglycerol (2-AG), reverse per se the sexual inhibition of sexually satiated males. Both eCBs interact with glutamatergic system to reverse the sexual inhibitory state. This work was aimed to determine the role played by GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors in the actions of GABA to maintain the sexual inhibition of sexually satiated rats, and their possible interaction with AEA and 2-AG to reverse sexual satiety. To this aim, different doses of the GABA<sub>B</sub> receptor antagonist baclofen were systemically administered to sexually satiated males. Besides, combinations of these eCBs with bicuculline or baclofen, at doses subthreshold for reversing sexual satiety, were systemically administered to independent groups of sexually satiated males, to determine if their effects added up to reverse sexual satiety. Results showed that baclofen failed to reverse sexual satiety, and that AEA did not act together with bicuculline or baclofen to reverse sexual satiety. 2-AG cancelled the sexual facilitatory effects of subthreshold and effective dose of bicuculline and, when combined with baclofen, it showed a clear tendency to reverse satiety that did not attain statistical significance. It is concluded that: a) AEA does not interact with the GABAergic transmission to reverse sexual satiety; b) 2-AG cancels the sexual facilitatory effects of bicuculline and enhances those of baclofen sexually satiated rats; c) GABA<sub>B</sub> receptors do not play a role in the GABA-mediated maintenance of the sexual inhibition of sexually satiated rats and d) AEA and 2-AG seem to reverse sexual satiety by different mechanisms.

## **Introducción**

Las conductas recompensantes naturales, como la conducta sexual y la ingesta de alimento se integran en el circuito mesolímbico dopaminérgico (MSL) (Adinoff et al., 2004; Baik, 2013; Hull & Rodríguez-Manzo, 2017). En este circuito se procesan también los efectos recompensantes de las drogas de abuso (Adinoff et al., 2004; Baik, 2013). La estimulación intensa de este circuito cerebral, producida por las drogas de abuso, induce cambios permanentes en su funcionamiento (Adinoff et al., 2004; O'Brien, 2009). En cambio, la estimulación intensa del MSL por estímulos recompensantes naturales produce cambios en su funcionamiento que son transitorios. La cópula es una conducta motivada que activa al MSL y la cópula hasta la saciedad lo activa de manera intensa produciendo cambios de larga duración en su funcionamiento, pero que son reversibles (Rodríguez-Manzo et al., 2011). El análisis del fenómeno de saciedad sexual provee un modelo para el estudio de los mecanismos involucrados en la inducción de modificaciones de largo plazo en el funcionamiento del MSL.

### **1. Conducta Sexual Masculina**

La conducta sexual masculina de la rata está constituida por respuestas motoras estereotipadas que incluyen:

- La conducta de monta, durante la cual el macho aborda a la hembra por la parte trasera, realiza movimientos pélvicos superficiales y la desmonta suavemente.
- La conducta de intromisión, en la que el macho realizando una monta, logra la penetración intravaginal y presenta movimientos pélvicos, para después desmontar a la hembra violentamente y salir disparado en reversa.
- La conducta de eyacuación, que consiste en una intromisión en la que el macho realiza movimientos pélvicos, uno de los cuales es más prolongado e intenso y coincide con la eyección seminal.

Estas tres respuestas motoras conforman un patrón copulatorio de la rata, integrado por una serie de montas e intromisiones intercaladas que culminan con la eyaculación. Después de ésta, el animal presenta un periodo de refractariedad a la estimulación sexual denominado intervalo post-eyaculatorio (Hull & Rodríguez-Manzo, 2017). Este periodo refractario consta de una fase absoluta y una fase relativa. La primera fase abarca el primer 75% de la duración del intervalo post-eyaculatorio y se caracteriza por la emisión de vocalizaciones ultrasónicas de 22Hz; el intervalo post-eyaculatorio relativo, dura el 25% del tiempo restante y puede ser abolido si el animal recibe suficiente estimulación (Hull & Rodríguez-Manzo, 2017). A la serie de eventos que transcurren desde la primera intromisión hasta la eyaculación se le denomina serie eyaculatoria. Cuando se incluye al intervalo post-eyaculatorio, entonces se le denomina serie copulatoria.

Cuando las ratas macho adquieren experiencia sexual el patrón copulatorio se vuelve muy estable, lo que ha permitido el desarrollo de medidas temporales y numéricas para evaluar la cópula. En el análisis de la conducta sexual masculina se emplean los siguientes parámetros:

*Latencia de Monta.* Es el periodo que comprende desde el contacto entre macho y la hembra hasta que aparece la primera monta o intromisión.

*Latencia de Intromisión.* Es el periodo comprendido entre que el macho y la hembra hacen contacto hasta que se presenta la primera intromisión.

*Latencia de eyaculación.* Es el periodo que transcurre entre la primera intromisión y la eyaculación.

*Intervalo Post-eyaculatorio.* Es el periodo que transcurre entre la eyaculación y el reinicio de la cópula, dado por la aparición de la primera intromisión de la siguiente serie.

*Número de montas.* Es la cantidad de montas realizadas durante una serie eyaculatoria.

*Número de intromisiones.* Es la cantidad de intromisiones realizadas durante una serie eyaculatoria.

*Número de eyaculaciones.* Es la cantidad de eyaculaciones que realiza el animal durante el periodo de observación determinado.

## 2. Saciedad Sexual

Si se permite a una rata macho copular sin restricción con una misma hembra receptiva, presentará una serie de eyaculaciones sucesivas antes de cesar de copular, por estar sexualmente saciado. Se ha establecido que las ratas macho llegan a la saciedad sexual tras realizar un promedio de 7 series eyaculatorias sucesivas. Conforme se avanza en las series copulatorias se presenta un aumento exponencial en la duración del periodo post-eyaculatorio. Beach y Jordan utilizaron como criterio para considerar que un macho alcanzó la saciedad sexual, el que presentara un periodo de inactividad sexual de 30 min (Beach & Jordan, 1956). Más recientemente, Rodríguez-Manzo estableció como criterio de saciedad sexual que transcurrieran 90 min desde la última eyaculación, sin que el macho volviera a eyacular (Rodríguez-Manzo et al., 2011). A las 24 horas post-saciedad, los machos se comportan de 2 formas distintas cuando se les expone a una nueva hembra receptiva: dos tercios de la población no presenta conducta sexual, mientras que el otro tercio realiza una serie eyaculatoria tras la cual no reiniciará la cópula (Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1994). La inhibición sexual en ratas sexualmente saciadas permanece bien establecida 72 horas, después de lo cual hay una recuperación gradual de la actividad sexual. Se requieren 15 días de inactividad sexual para que los animales sexualmente saciados recuperen su capacidad eyaculatoria inicial (Rodríguez-Manzo et al., 2011). Esto quiere decir que el fenómeno de saciedad sexual es reversible de manera natural.

Mediante el uso de herramientas farmacológicas se ha logrado revertir la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas a las 24 h post-saciedad, así como identificar distintos sistemas de neurotransmisión que están involucrados en este fenómeno de inhibición sexual de larga duración. Se ha identificado la participación de los sistemas noradrenérgico, serotoninérgico, dopaminérgico, opioidérgico, glutamatérgico, GABAérgico y, más

recientemente el sistema endocannabinoide, en el fenómeno de saciedad sexual (Canseco-Alba & Rodríguez-Manzo, 2019).

### 3. Circuito Mesolímbico Dopaminérgico (MSL)

La dopamina (DA) es un neurotransmisor perteneciente a la familia de las catecolaminas cuyo precursor es la tirosina y la enzima que se encarga de su síntesis es la tirosina hidroxilasa. Al momento se han descrito 5 receptores para dopamina, los cuales se dividen en dos familias; la familia D1-like (receptores D1, D3 y D5) y la familia D2-like (receptores D2 y D4). Los receptores de ambas familias se encuentran acoplados a proteínas G; los de la familia D1-like a proteínas  $G_s$  que producen un aumento en los niveles de  $AMP_c$ , mientras que los de la familia D2-like se unen a proteínas  $G_i$  que producen el efecto contrario, disminuyen los niveles de  $AMP_c$  por inactivación de la adenilato ciclasa. La activación de los receptores D2-like produce también la apertura de canales de potasio que liberan este ion al espacio extracelular, llevando a la célula a un estado de hiperpolarización (Arias-Carrián et al., 2010)

Dos núcleos en el cerebro medio concentran la mayoría de los somas de neuronas DAérgicas y conforman dos circuitos paralelos. El primer núcleo es la sustancia nigra que proyecta al estriado dorsal y que origina la vía nigroestriatal y el segundo núcleo es el área tegmental ventral (ATV) que proyecta principalmente al núcleo accumbens (NAcc) y a la corteza prefrontal, conformando la vía mesocorticolímbica. Para fines de este trabajo nos enfocaremos en el circuito MSL que va del ATV al NAcc (Arias-Carrián et al., 2010).

El ATV se compone aproximadamente de un 60-65% de neuronas DAérgicas, de un 30% de neuronas GABAérgicas y aproximadamente un 5% de neuronas glutamatérgicas (Bouarab et al., 2019; Tan et al., 2012; Yamaguchi et al., 2007). Las neuronas DAérgicas se encuentran de manera predominante en la parte caudal y lateral del ATV (Bouarab et al., 2019). Se ha descrito que, de manera basal, las neuronas dopaminérgicas en el MSL

presentan un patrón de disparo de baja frecuencia (2-4 Hz), tipo marcapaso, que produce una liberación tónica de DA en el NAcc. Cuando el organismo está en presencia de un estímulo recompensante, el patrón de disparo de estas neuronas cambia a un disparo en ráfaga (15-30 Hz), que produce una liberación fásica de DA en el NAcc (Covey et al., 2017; Grace, 1991). La actividad basal de las células DAérgicas está mediada por la liberación tónica de GABA en el ATV que ejerce una inhibición tónica sobre la actividad de las neuronas DAérgicas. El cambio a un patrón de disparo en ráfaga está mediado por la liberación de glutamato, principalmente de aferentes glutamatérgicas provenientes de regiones como la corteza prefrontal, que activan receptores NMDA en las células DAérgicas del ATV (Grace et al., 2007).

El NAcc se ubica en el estriado ventral y se divide en dos regiones, el *shell* y el *core*. En cuanto a su arquitectura celular, está conformado en un 95% por neuronas espinosas medias (MSN), que son de naturaleza GABAérgica y que proyectan al ATV de forma directa o indirecta, haciendo un relevo en el pálido ventral. El 5% restante está constituido por 3 poblaciones de interneuronas: interneuronas GABAérgicas de disparo rápido (FSI), interneuronas GABAérgicas de bajo umbral (LTSI) e interneuronas colinérgicas (CIN) (Covey & Yocky, 2021; Russo & Nestler, 2013). Al NAcc llegan aferencias glutamatérgicas que provienen de la corteza prefrontal, la amígdala basolateral, el hipocampo y el tálamo entre otras (Covey & Yocky 2021; Britt et al., 2012; Russo & Nestler, 2013). El MSL está asociado al procesamiento de recompensas producidas por estímulos naturales, como la ingesta de alimento y la conducta sexual, o por estímulos artificiales como las drogas de abuso (Adinoff et al., 2004; Baik, 2013; Hull & Rodríguez-Manzo, 2017). La comprensión acerca de cómo participa el MSL en el procesamiento de un estímulo recompensante se ha ido modificando con el paso del tiempo y con el surgimiento de nuevas evidencias. Wise en 1980 propuso una hipótesis en la cual la DA tenía un papel central en la hedonia o el placer que proporcionan dichos estímulos; se consideraba que el aumento en los niveles de DA en el NAcc producía un incremento en la sensación de placer (Wise,

1980) y viceversa, que niveles disminuidos de este neurotransmisor provocaban un decremento en el placer. Años más tarde la evidencia científica apuntó hacia otra dirección, indicando que la transmisión DAérgica del MSL participaba en el fenómeno del “wanting” o deseo de la recompensa en lugar del “liking” o el placer de experimentarla (Adinoff, 2004).

### 3.1. Relación del MSL con la conducta sexual masculina

El sistema MSL es uno de los centros integradores de la conducta sexual masculina (Hull & Rodríguez-Manzo, 2017). Mediante distintos abordajes se ha determinado que la DA a nivel de sistema nervioso central (SNC) tiene un rol facilitador de la conducta sexual masculina. Así, la administración de agonistas dopaminérgicos favorece la expresión de la conducta sexual en ratas macho sexualmente expertas y en copuladoras lentas. En estudios de los años 70 se determinó que la administración sistémica de apomorfina, agonista no selectivo de receptores DAérgicos, o de L-DOPA, un precursor de DA, facilitan la ejecución de conducta sexual (Paglietti et al., 1978; Tagliamonte et al., 1974). También se demostró que la administración sistémica tanto de apomorfina como de un agonista de receptores D2, el (+)3-PPP, disminuye el número de intromisiones previas a la eyaculación, así como la LE (Ahlenius & Larsson, 1984). En cambio, la administración sistémica del antagonista no selectivo de receptores DAérgicos, haloperidol, así como de antagonistas específicos de receptores D2-like y de receptores D1-like, tiene efectos inhibidores sobre la cópula, incrementando la LM, la LI y el IPE (Pfaus & Phillips, 1989; Pfaus & Phillips, 1991). La participación del MSL en la expresión de la conducta sexual masculina se confirma en los estudios de Rodríguez-Manzo & Pellicer que muestran que la estimulación eléctrica tanto del ATV (Rodríguez-Manzo & Pellicer, 2007) como del NAcc (Rodríguez-Manzo & Pellicer, 2010) facilita la expresión de la conducta sexual en ratas macho.

Por otro lado, se ha descrito que la cópula activa al MSL, ya que la exposición de ratas macho a una hembra sexualmente receptiva aumenta la

liberación de DA en el NAcc, y cuando el animal copula las concentraciones de DA se elevan aún más (Pfaus et al., 1990). Así mismo se ha detectado un aumento en la expresión de c-fos, un proto-oncogén marcador de actividad neuronal, en el ATV durante la actividad sexual (Balfour et al., 2004).

#### 4. Sistema Endocannabinoide

En 1964 Gaoni y Mechoulam reportaron la caracterización de uno de los compuestos psicoactivos de la marihuana, el  $\Delta^9$ -Tetrahidrocannabinol (THC) (Gaoni & Mechoulam, 1964). Posteriormente se descubrió que el THC era ligando de dos receptores acoplados a proteínas Gi/o, que fueron denominados receptores a cannabinoides 1 y 2 (CB1R y CB2R), enumerados por el orden en el que se descubrieron (Matsuda et al., 1990; Munro et al., 1993). Los ligandos endógenos de estos receptores, denominados endocannabinoides (eCB), que se describieron primero y que al momento son los mejor caracterizados, son la araquidonoiletanolamida o anandamida (AEA) (Devane et al., 1992) y el 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (Mechoulam et al., 1995). Actualmente se considera que el sistema endocannabinoide está compuesto por los eCB, sus receptores y las enzimas que participan tanto en su síntesis como en su degradación (Di Marzo et al., 1998).

##### 4.1. Endocannabinoides

Los eCB son compuestos lipídicos derivados del ácido araquidónico que se producen en diversos tejidos como el sistema nervioso y células del sistema inmune (Covey et al., 2017; Katona & Freund, 2012; Di Marzo et al., 2004). En el sistema nervioso los eCBs, a diferencia de otros neurotransmisores, no son almacenados en vesículas, sino que son sintetizados a demanda, es decir, su síntesis se inicia en respuesta a estímulos específicos como el aumento de la actividad neuronal (Katona & Freund, 2012). El transporte de los endocannabinoides al espacio sináptico aún es un tema que genera controversia. Se ha postulado que para la liberación de estas moléculas al

espacio sináptico es necesario un transportador como el AMT (transportador membranal de anandamida) (Adermark & Lovinger, 2007), pero otros autores describen que la liberación es por difusión simple (Glaser et al., 2003).

La AEA es un agonista parcial de los CB1R y CB2R, mientras que el 2-AG es un agonista completo de ambos receptores (Katona & Freund, 2012). La síntesis de AEA se lleva a cabo por distintas rutas metabólicas, la principal es aquella en la que el fosfolípido de membrana, fosfatidiletanolamina, es convertido a la N-araquidonilfosfatidiletanolamina (NAPE), precursor de AEA, que es hidrolizada por la fosfolipasa D (PLD) para producir AEA. La PLD es activada por el incremento en las concentraciones intracelulares de  $Ca^{2+}$ , por lo que este evento induce la síntesis de AEA. La AEA es degradada principalmente por la enzima aminohidrolasa de ácidos grasos (FAAH, por sus siglas en inglés) a ácido araquidónico y etanolamida; también puede ser degradada por la ciclooxigenasa 2 (COX-2) dando como producto prostamidas (Zou & Kumar, 2018; Lu & MacKie, 2016).

La síntesis y liberación de 2-AG es secundaria a la despolarización de la membrana neuronal y el posterior incremento en los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$ , así como en respuesta a la activación de ciertos GPCRs como los receptores a orexinas (OX1R), los receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos y los receptores glutamatérgicos metabotrópicos mGluR5 (Lu & Mackie, 2016; Kano et al., 2009). El incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular activa a la fosfolipasa C- $\beta$  (PLC- $\beta$ ) que produce diacilglicerol, el cual posteriormente será hidrolizado por las diacilglicerol-lipasas (DGL)  $\alpha$  o  $\beta$  para sintetizar 2-AG. Las enzimas encargadas de la degradación de 2-AG son, en primer lugar, la monoacilglicerol-lipasa (MAGL) que hidroliza el 2-AG produciendo ácido araquidónico y glicerol; en segundo lugar, la COX-2 y otras enzimas transforman al 2-AG en otras moléculas bioactivas (Zou & Kumar, 2018; Lu & MacKie, 2016; Kano et al., 2009).

## 4.2. Receptores a cannabinoides

De los dos receptores a cannabinoides descritos, el CB1R se localiza de manera predominante en el SNC en regiones como el hipotálamo, los ganglios basales, el cerebelo, la corteza, etc. El CB2R, se ha localizado de manera importante en células del sistema inmune (Katona & Freund, 2012; Matsuda et al., 1990; Munro et al., 1993; Pertwee, 1997), aunque recientemente también se ha descrito su presencia en células de distintas zonas del SNC como el cerebelo. En esta región se localizó al CB2R en células gliales y en vasos sanguíneos, y en la médula espinal se le ha identificado, por medio de inmunohistoquímica, co-localizado con marcadores neuronales (Atwood & Mackie, 2010). Ambos receptores son GPCRs acoplados a proteínas  $G_{i/o}$ , por lo que su activación produce hiperpolarización de la célula mediante disminución en la concentración de  $AMP_C$ , inhibición de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje y activación de canales GIRK (Covey et al., 2017; Ibsen et al., 2017).

En el circuito MSL se han identificado CB1Rs tanto en el ATV como en el NAcc. También se ha descrito la expresión de mRNA para el CB2R en las neuronas DAérgicas del ATV de rata y ratón, y que la administración intra-NAcc de agonistas CB2R en rata reduce la liberación de DA por lo que se ha propuesto que, en el NAcc, el CB2R, se expresa en las terminales de las neuronas DAérgicas provenientes del ATV (Foster et al., 2016; Zhang et al., 2014, 2017).

En el ATV, los CB1R se expresan en las interneuronas GABAérgicas, en las neuronas glutamatérgicas y en las terminales de aferentes tanto GABAérgicas como glutamatérgicas (Mátyás et al., 2008; Fitzgerald et al., 2012; Covey et al., 2017). En el NAcc, los CB1R se localizan en terminales glutamatérgicas que provienen de distintas áreas como la corteza prefrontal, así como en las FSI (Winters et al., 2012; Covey & Yocky, 2021). No se han identificado en las MSN, en las CIN, ni en las LTSI (Covey & Yocky, 2021; Covey et al., 2017).

## 5. Papel de los endocannabinoides en el MSL

En el circuito MSL, los eCBs modulan la actividad de las neuronas DAérgicas del ATV y en el NAcc estos neuromoduladores participan en fenómenos de plasticidad sináptica, así como en la regulación de comportamientos apetitivos. Por ejemplo, un estudio de 2007 reporta que la administración de AEA directamente en el NAcc shell medial produjo un incremento en la actividad neuronal de dicha región, evaluado mediante la detección de c-Fos, y un incremento en la conducta de “liking” hacia la sacarosa, y que microinyecciones de 2-AG, también dentro del NAcc shell medial, aumentaron la ingesta de alimento en ratas (Mahler et al., 2007). Los eCBs son sintetizados por las neuronas DAérgicas en el ATV y por las MSN en el NAcc. La unión de los eCBs a los CB1R presinápticos inhibe la liberación de neurotransmisor (NT). Esta inhibición de la liberación de NT recibe el nombre de despolarización inducida por supresión de la excitación (DSE), cuando ocurre en terminales de neuronas glutamatérgicas, y cuando es en terminales GABAérgicas, se denomina despolarización inducida por supresión de la inhibición (DSI). Tanto la DSE como la DSI son formas de plasticidad sináptica de corto plazo (STD), pero los eCB también están involucrados en fenómenos de plasticidad sináptica de largo plazo (Lu & MacKie, 2016; Covey et al., 2017; Covey & Yocky, 2021).

Se ha identificado que los CB2R se expresan en células DAérgicas del ATV y un estudio reciente señala que están implicados en la modulación de la respuesta recompensante de sustancias como el alcohol (Liu et al., 2017). Además, al estar expresados también en las terminales de las neuronas DAérgicas que llegan al NAcc, su activación inhibiría la liberación de DA en el NAcc (Zhang et al., 2017; Covey & Yocky, 2021).

## 6. Transmisión GABAérgica y circuito MSL

El ácido gamma aminobutírico (GABA), es el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central; es sintetizado a partir del glutamato por medio de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), ingresa a las vesículas

por el transportador vesicular de GABA (VGAT) y es metabolizado por la enzima GABA aminotransferasa (GABA-T), dando como productos succinato y glutamato. En su recaptura del espacio extracelular participan los transportadores membranales de GABA: GAT-1, GAT-2 y GAT-3 (Hampe et al., 2018; Roth & Draguhn, 2012).

Se han identificado 3 receptores GABAérgicos: GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> y GABA<sub>C</sub> (Chebib, 2004), aunque este último se ha reclasificado como un subtipo de receptor GABA<sub>A</sub> (Olsen & Sieghart, 2010). Los receptores GABA<sub>A</sub> (Fig.1) son receptores ionotrópicos que, tras ser activados, sufren un cambio conformacional que permite el paso de Cl<sup>-</sup> del espacio extracelular al intracelular a través del canal, produciendo hiperpolarización de la neurona. Los receptores GABA<sub>A</sub> son pentámeros formados por distintas combinaciones de las subunidades: α (con las isoformas α1-α6), β (con las isoformas β1-β3), γ (con las isoformas γ1-γ3) y una isoforma de la subunidad δ (Sigel & Steinmann, 2012). En el sistema nervioso central la mayoría de los receptores GABA<sub>A</sub> tienen una conformación 2(α1), 2(β2) y γ2 (Hampe et al., 2018).

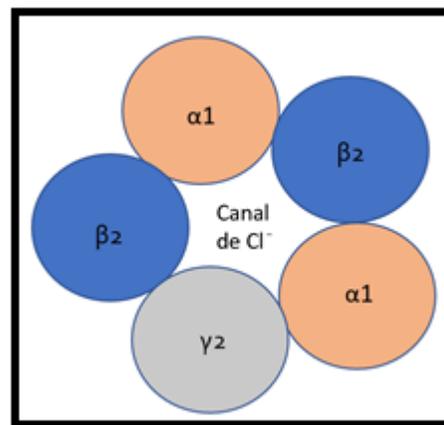


Figura 1. Esquema representativo de la conformación estructural del receptor GABA<sub>A</sub>. Modificado de Vinkers & Olivier, 2012

Se han descrito distintos subtipos de receptor GABA<sub>A</sub> que en su conformación tienen una subunidad α diferente; esta variación es relevante ya que tienen diferente localización neuronal, así como diferencias en la forma en la que modulan la actividad neuronal. Por ejemplo, los receptores GABA<sub>A</sub> que contienen las subunidades α1, α2 y α3 se ubican de forma predominante en las regiones sinápticas, mientras que los que tienen las subunidades α4 y α5

se encuentran mayormente en las regiones extrasinápticas. Los receptores GABA<sub>A</sub> sinápticos median la inhibición fásica o rápida, mientras que la inhibición tónica es mediada por los receptores GABA<sub>A</sub> extrasinápticos (Engin et al., 2018). En el ATV los subtipos predominantes de receptor GABA<sub>A</sub> son los GABA<sub>A</sub>α1 y GABA<sub>A</sub>α3 (Ciccarelli et al., 2012). En esta región, las neuronas DAérgicas expresan los subtipos GABA<sub>A</sub>α3 y GABA<sub>A</sub>α4, mientras que las interneuronas GABAérgicas expresan el subtipo GABA<sub>A</sub>α1 (Engin et al., 2018; Ciccarelli et al., 2012). En el NAcc se ha identificado la expresión de receptores GABA<sub>A</sub>α4 en las MSN de tipo D1- y D2-like; adicionalmente, se ha descrito la expresión de receptores GABA<sub>A</sub>α2 en las MSN (Engin et al., 2018).

Los receptores GABA<sub>B</sub> (Fig.2) son receptores metabotrópicos, GPCRs de la clase C. Estos receptores se caracterizan por formar dímeros y por contener un dominio extracelular denominado VFT (Venus atrapamoscas, por sus siglas en inglés), por su similitud con el mecanismo de estas plantas carnívoras. Están conformados por dos subunidades, la subunidad GABA<sub>B1</sub> y la subunidad GABA<sub>B2</sub> que forman un heterodímero. Cada una de las subunidades está formada por un dominio extracelular, 7 dominios transmembranales y un dominio citoplásmico. Los dominios extracelulares se componen del dominio VFT.

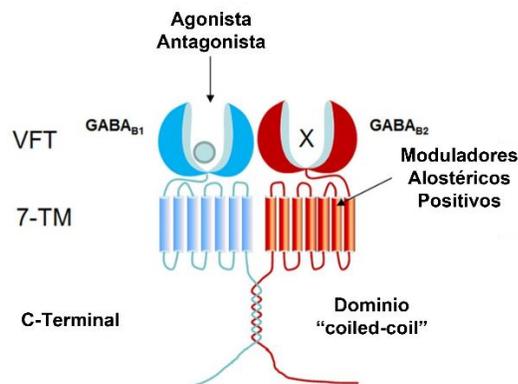


Figura 2. Esquema representativo de la conformación estructural del receptor GABA<sub>B</sub> formado por 2 subunidades GABA<sub>B1</sub> (azul) GABA<sub>B2</sub> (rojo) Modificado de Xu et al., 2014

Los receptores GABA<sub>B</sub> están acoplados a proteínas Gi/o, por lo tanto, su activación inhibe a la adenilato ciclasa, activa canales rectificadores de K<sup>+</sup> activados por proteína G (GIRK) e inhibe canales de Ca<sup>2+</sup> activados por voltaje, lo que da por resultado la inhibición de la actividad neuronal (Frangaj & Fan, 2018). Se han identificado dos isoformas de la subunidad GABA<sub>B1</sub> que son: GABA<sub>B1a</sub> y GABA<sub>B1b</sub>. Tanto los receptores GABA<sub>B</sub> presinápticos como los postsinápticos pueden expresar las subunidades GABA<sub>B1a</sub> o GABA<sub>B1b</sub>, sin embargo, se ha reportado que los receptores presinápticos expresan preferentemente la subunidad GABA<sub>B1a</sub> y los postsinápticos expresan preferentemente la subunidad GABA<sub>B1b</sub> (Kasten & Boehm, 2015; Pérez-Garci et al., 2006; Waldmeier et al., 2008). Dentro del MSL, se ha descrito que en ATV hay mayor expresión del ARNm de la isoforma GABA<sub>B1a</sub> y en el NAcc hay mayor expresión del ARNm de la isoforma GABA<sub>B1b</sub> (Kasten & Boehm, 2015). Cabe mencionar que tanto los receptores GABA<sub>B1a</sub> como los GABA<sub>B1b</sub> pueden funcionar como autorreceptores o heterorreceptores (Kasten & Boehm, 2015). En el ATV los somas de las neuronas DAérgicas expresan receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> postsinápticos (Ciccarelli et al., 2012) y se ha descrito la presencia de receptores GABA<sub>A</sub> en el soma de interneuronas GABAérgicas (Engin et al., 2018). También se han identificado receptores GABA<sub>B</sub> presinápticos en las terminales GABAérgicas y glutamatérgicas que llegan al ATV (Xi & Stein, 1998; Wirtshafter et al., 2001; Cruz et al. 2004; Ciccarelli et al., 2012).

Las neuronas GABAérgicas en el ATV representan alrededor del 30% de todas las neuronas de esta área cerebral (Dobi et al., 2010) y se distribuyen en las regiones rostral y medial, así como en el núcleo tegmental rostromedial o cola del ATV (Bouarab et al., 2019; Creed et al., 2014). En la Fig.3 se muestra un esquema con la distribución de las neuronas DA y GABAérgicas en el ATV.

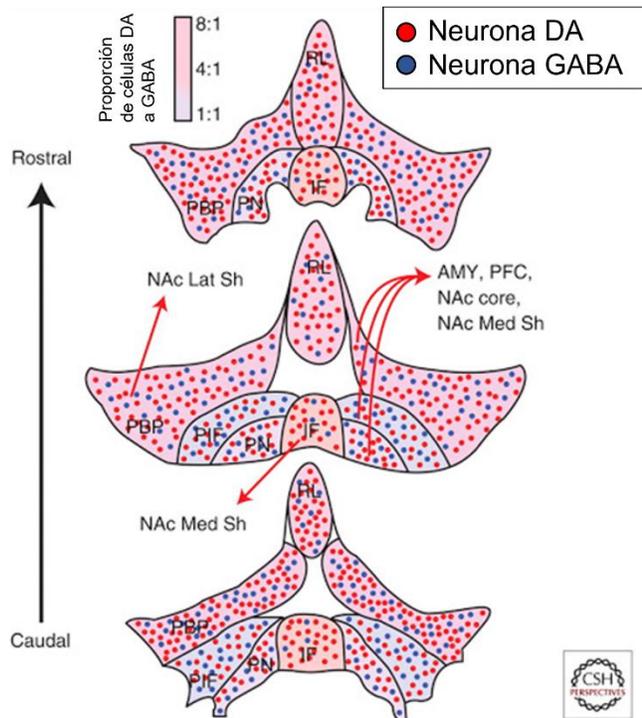


Figura 3. Proporción de neuronas DA y GABA en los subnúcleos del ATV. Subnúcleos: IF (interfascicular), PN (Paranigral), PIF (Parainterfascicular), RL (Linear rostral), PBP (Parabraquial). Modificado de Mazei & Nestler, 2012.

Existen varias subpoblaciones de neuronas GABAérgicas dentro del ATV; unas producen inhibición de manera local, ya sea sobre otras neuronas GABAérgicas o sobre neuronas DAérgicas, mientras que otras proyectan sus axones hacia estructuras más lejanas como el NAcc, donde hacen sinapsis con las CIN, a la amígdala central y la corteza prefrontal, en donde contribuyen a la regulación de los fenómenos de recompensa y aversión (Bouarab et al., 2019). Se ha descrito que las neuronas GABAérgicas del ATV están sujetas a un control inhibitorio aferente que proviene de diversas estructuras como el área preóptica media, el hipotálamo lateral y el NAcc (Bouarab et al., 2019).

Las neuronas GABAérgicas principalmente de la cola del ATV mantienen una inhibición tónica sobre las neuronas DAérgicas (Bourdy & Barrot, 2012); se ha descrito que su activación optogenética inhibe la actividad de las neuronas DAérgicas (Tan et al., 2012). Se ha descrito también, que la transmisión GABAérgica en el ATV se bloquea por opioides endógenos que se unen a receptores  $\mu$  localizados en las terminales GABAérgicas, lo que da

por resultado que las neuronas DAérgicas presenten actividad en ráfaga y liberación fásica de DA en el NAcc (Bourdy & Barrot, 2012; Nicola et al., 2005).

#### 7. Transmisión GABAérgica y conducta sexual de la rata macho

El papel de la transmisión GABAérgica en la conducta sexual masculina ha sido estudiado mediante el uso de herramientas farmacológicas. En estudios de Fernández-Guasti y colaboradores se determinó que fármacos que antagonizaban la transmisión GABAérgica, como el antagonista de receptores GABA<sub>A</sub> bicuculina, administrados en el área preóptica media (APOM) del hipotálamo, facilitan la actividad sexual de ratas macho. Esta facilitación se manifiesta por una disminución en la latencia de eyaculación, así como de la duración del intervalo post-eyaculatorio (Fernández-Guasti et al., 1986a, 1985, 1986b). Se ha descrito también que la bicuculina, administrada en el APOM, produce una reducción en la duración de las vocalizaciones ultrasónicas producidas por las ratas macho durante el IPE. Los autores refieren que este efecto puede significar que la transmisión GABAérgica está involucrada en la inhibición sexual que se presenta durante el periodo refractario absoluto (Fernández-Guasti et al., 1986c). En un estudio en el que se midieron niveles de neurotransmisores en líquido cefalorraquídeo, se encontró un incremento en los niveles de GABA tras la eyaculación (Qureshi & Södersten, 1986), lo cual refuerza la noción de que el GABA participa en la inhibición sexual característica del IPE. En otro estudio, se describió que la administración en APOM de fármacos que incrementan la transmisión GABAérgica, produce una reducción en la conducta sexual de ratas macho. Un ejemplo de ello son las benzodiazepinas, diazepam y clordiazepóxido, que se unen al receptor GABA<sub>A</sub> y producen una inhibición en la conducta sexual, misma que es revertida por antagonistas del receptor GABA<sub>A</sub> (Agmo y Fernández, 1991). Otros fármacos como la moxidectina, un antiparasitario que favorece la actividad de GABAérgica tras unirse al canal de Cl<sup>-</sup> del receptor GABA<sub>A</sub>, produce una disminución en la actividad sexual (Rodrigues-Alves et al., 2008). Así mismo,

el progabide, un agonista parcial del receptor GABA<sub>A</sub>, reduce la actividad sexual, efecto que es bloqueado por bicuculina (Agmo et al., 1997).

En lo que refiere a la participación de los receptores GABA<sub>B</sub> en la conducta sexual masculina, se ha reportado que la administración sistémica de baclofen, antagonista inespecífico de los receptores GABA<sub>B</sub>, tiene efectos inhibitorios sobre la conducta sexual, observados como una disminución significativa del porcentaje de animales que presenta las conductas de monta, intromisión y eyaculación (Paredes y Agmo, 1989).

### **Antecedentes directos**

En ratas macho sexualmente saciadas, dosis bajas de los eCBs AEA y 2-AG, administradas por vía sistémica, revierten la inhibición sexual que las caracteriza. Este efecto se observa como un aumento significativo en el porcentaje de animales sexualmente saciados que es capaz de reiniciar la cópula tras la eyaculación, en respuesta a la manipulación farmacológica (Canseco-Alba & Rodríguez-Manzo, 2014; 2019). Esta reversión de la inhibición sexual se replica con la administración intra-ATV de AEA (Canseco-Alba & Rodríguez-Manzo, 2016), lo que indica que los eCBs actúan en esta área cerebral para revertir la saciedad sexual.

Por otro lado, la transmisión glutamatérgica participa en el mantenimiento de la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas, puesto que el bloqueo de los receptores a glutamato tipo NMDA, AMPA o mGluR5 revierte la saciedad sexual (Rodríguez-Manzo, 2015). Se ha demostrado que los eCBs AEA y 2-AG interactúan con el sistema glutamatérgico para revertir la saciedad sexual, ya que la co-administración de dosis subefectivas de antagonistas de los receptores NMDA o mGluR5 con dosis subefectivas de AEA o 2-AG, a las 24 horas post-saciedad, produce un aumento significativo en el porcentaje de animales sexualmente saciados que reinicia la cópula después de la eyaculación. Para determinar si la interacción entre ambos sistemas ocurre en el ATV, se administró, una dosis efectiva de 2-AG directamente en esa área, a la vez que por vía sistémica se administraba una

dosis sub-efectiva del agonista de los receptores mGluR5, CHPG. Se observó que el CHPG canceló el efecto de reversión del 2-AG en los machos sexualmente inhibidos. En conjunto, estos resultados apoyan la noción de que existe una interacción entre eCBs y el sistema glutamatérgico para revertir la saciedad sexual y que el ATV participa en dicha interacción (Hernández, 2017, tesis de maestría).

En cuanto a la transmisión GABAérgica, ésta también participa en el mantenimiento de la inhibición sexual de ratas saciadas, ya que el bloqueo de receptores GABA<sub>A</sub> con el antagonista bicuculina, tanto por vía sistémica como intra-ATV, revierte la saciedad sexual. Cabe destacar que la reversión de la saciedad sexual mediada por receptores GABA<sub>A</sub> no ocurre tras la administración intra-APOM de bicuculina (Rodríguez-Manzo & Canseco-Alba, 2017; Rodríguez-Manzo et al., 2000).

### **Planteamiento del problema**

Las ratas sexualmente saciadas están sexualmente inhibidas a las 24 h post-saciedad. Se ha demostrado que dosis bajas de los eCBs AEA y 2-AG revierten esta inhibición sexual. En el circuito MSL, los eCBs regulan la actividad de las neuronas dopaminérgicas a través de modular la liberación de GABA y de glutamato en el ATV. Está reportado que dosis sub-efectivas tanto de AEA como de 2-AG sinergizan con dosis sub-efectivas de antagonistas de receptores glutamatérgicos NMDA y mGluR5 para revertir la saciedad sexual, lo que sugiere que para ello los eCBs activan a los CB1R de las terminales glutamatérgicas.

Si bien se sabe que la administración tanto sistémica como intra-ATV de un antagonista de receptores GABA<sub>A</sub> revierte la inhibición sexual de ratas saciadas, que las terminales GABAérgicas del ATV expresan CB1R y que hay síntesis y liberación de eCB en esta región cerebral durante la cópula hasta la saciedad (Rodríguez-Manzo et al 2021), aún no se conoce si los eCBs interactúan también con la transmisión GABAérgica para revertir la saciedad sexual. Por otro lado, las acciones del GABA en el circuito MSL están

mediadas tanto por receptores GABA<sub>A</sub> como por receptores GABA<sub>B</sub>, sin embargo, no se sabe si las acciones de GABA para el mantenimiento de la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas involucran también a los receptores GABA<sub>B</sub>.

### **Hipótesis**

1. La reversión de la saciedad sexual producida por los eCBs AEA y 2-AG involucra el bloqueo de la transmisión GABAérgica.
2. Las acciones del GABA para mantener la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas involucran tanto a receptores GABA<sub>A</sub> como a receptores GABA<sub>B</sub>.

### **Objetivos generales**

1. Establecer si los eCBs AEA y 2-AG interactúan con el sistema GABAérgico para revertir la saciedad sexual.
2. Determinar la posible participación del receptor GABA<sub>B</sub> en las acciones del GABA para mantener la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas.

### **Objetivos específicos**

1. Determinar si los receptores GABA<sub>A</sub> participan en la interacción de 2-AG y AEA con la transmisión GABAérgica para revertir la saciedad sexual.
2. Establecer si los receptores GABA<sub>B</sub> participan en el mantenimiento de la inhibición sexual de ratas sexualmente exhaustas.
3. Determinar si los receptores GABA<sub>B</sub> participan en la interacción de 2-AG y AEA con la transmisión GABAérgica para revertir la saciedad sexual.

## **Material y Métodos**

### *Animales*

Se utilizaron ratas Wistar macho y hembra, mantenidas en condiciones controladas de humedad y temperatura, bajo un ciclo de luz-oscuridad invertido (12 h/12 h), con acceso a alimento e hidratación a libre demanda. Los animales se alojaron en cajas de acrílico en grupos de 8. Se utilizaron machos adultos (250-300 g), sexualmente expertos, que son aquéllos que presentan latencias de eyaculación menores a 15 minutos en por lo menos 3 de 5 sesiones de cópula, y hembras sexualmente receptivas como estímulo. La receptividad sexual se indujo por la administración secuencial de benzoato de estradiol (12 µg/rata s.c.) seguida, 24 h después, de progesterona (6 mg/rata, s.c.); las hembras están sexualmente receptivas 4 h después de la inyección de progesterona.

### *Registro de la conducta sexual*

Las pruebas de conducta sexual se realizaron en la fase oscura del ciclo, en un cuarto iluminado con luz roja. Se colocó a cada macho en un cilindro de acrílico con una cama de aserrín y se les permitió una habituación de 5 minutos, tras los cuales se introdujo una hembra sexualmente receptiva y se registró la conducta sexual. Los parámetros que se registraron fueron: la latencia de intromisión (LI), el número de montas (M) e intromisiones (I) que preceden a la eyaculación, la latencia de eyaculación (LE) y el intervalo post-eyaculatorio (IPE). Así mismo se registró el porcentaje de sujetos que presentó las respuestas de monta, intromisión, eyaculación y que reinició la cópula después de la eyaculación.

### *Paradigma de saciedad sexual*

Se permitió a los machos sexualmente expertos copular sin restricción, con una misma hembra receptiva, hasta cumplir con el criterio de saciedad sexual: 90 min desde la última eyaculación sin que el macho vuelva a eyacular (Rodríguez-Manzo et al., 2011). Veinticuatro horas después se sometió a los

animales a una nueva prueba de conducta sexual con una hembra receptiva, previa administración de los tratamientos a evaluar y se registró la actividad sexual durante 60 minutos o hasta que el animal ejecutara 2 series eyaculatorias. Se dio por terminada la prueba cuando transcurría un periodo de 30 minutos: 1) sin que el animal realizara una intromisión, 2) sin que eyaculara después de una intromisión o 3) sin que reiniciara la cópula después de la eyaculación.

#### *Actividad Ambulatoria*

Para descartar que los tratamientos farmacológicos alteraran la locomoción del animal afectando la ejecución de la conducta sexual, se analizó la actividad motora espontánea de los animales. Para ello se les colocó en una caja de acrílico de 33 x 44 x 60 cm, con la base dividida en 12 cuadrantes (11x11cm cada uno) y se les permitió explorarla durante 5 minutos. Se cuantificó el número de cruces que realiza el animal de un cuadrante a otro. Entre pruebas se realizó la limpieza de la caja con una solución limpiadora cuyo propósito es eliminar los desechos del animal, así como los olores que pudieran modificar la deambulación del siguiente sujeto.

#### *Fármacos*

La siguiente tabla detalla los fármacos utilizados para este trabajo, sus vehículos y vía de administración.

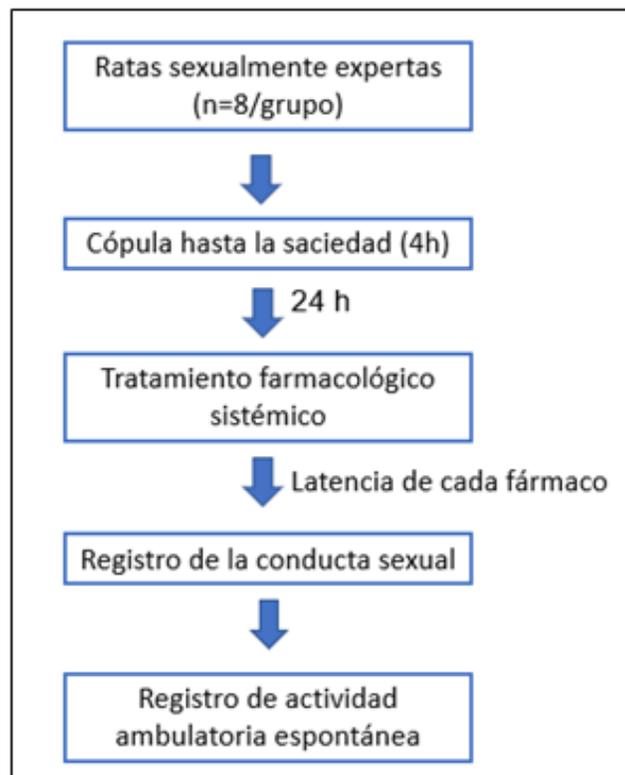
Fármaco	Vehículo	Vía de administración
Benzoato de estradiol	Aceite de maíz	Subcutánea
Progesterona	Aceite de maíz	Subcutánea
2-Araquidonoilglicerol (2-AG)	Mezcla de Sol. salina, alcohol y Tween 80	Intraperitoneal
Anandamida (AEA)	Mezcla de Sol. salina, alcohol y Tween 80	Intraperitoneal
Baclofen	Sol. Salina	Intraperitoneal
Bicuculina	Sol. Salina	Intraperitoneal

### Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para analizar el efecto de distintas dosis de un tratamiento sobre los parámetros finos de la cópula y sobre la actividad locomotora. Para el análisis del porcentaje de animales que presentan las distintas respuestas sexuales se utilizó la prueba de *F* de Fisher. Se utilizó el programa *Sigma Plot*, versión 12.0, para realizar los análisis. El nivel de significancia se estableció en  $p < 0.05$ .

### Diseño experimental

Para todos los experimentos se utilizaron ratas macho, sexualmente saciadas, a las que se les administraron los distintos tratamientos a las 24 h post-saciedad, se consideraron las siguientes latencias para los fármacos utilizados: Bicuculina: 20 min., baclofen: 30 min., AEA y 2-AG: 0 min. Posteriormente se registró su conducta sexual. Al finalizar las pruebas de conducta sexual se realizó la prueba de actividad locomotora. (Esquema 1).



Esquema 1. Diseño experimental

A continuación, se detallan las series experimentales que se realizaron para cumplir con cada uno de los objetivos particulares.

**Objetivo 1.** Para determinar si los receptores GABA<sub>A</sub> participan en la interacción de 2-AG y AEA con la transmisión GABAérgica para revertir la saciedad sexual se realizaron los siguientes experimentos:

*Experimento 1*

Se realizó una curva dosis-respuesta de dosis bajas de bicuculina para identificar una dosis sub-efectiva para la reversión de la saciedad.

*Experimento 2*

Se administró una combinación de dosis sub-efectivas de bicuculina y de AEA para determinar si revertían la saciedad sexual.

*Experimento 3*

Se administró una combinación de dosis sub-efectivas de bicuculina y 2-AG para determinar si revertían la saciedad sexual.

**Objetivo 2.** Para determinar si en el mantenimiento de la inhibición sexual de ratas sexualmente exhaustas mediado por GABA participan los receptores GABA<sub>B</sub>, se realizaron los siguientes experimentos:

*Experimento 4*

Se determinó el efecto de diferentes dosis del agonista de receptores GABA<sub>B</sub>, baclofen, y de su vehículo sobre la conducta sexual de ratas sexualmente saciadas

**Objetivo 3.** Para determinar si los receptores GABA<sub>B</sub> participan en la interacción de 2-AG y AEA con la transmisión GABAérgica para revertir la saciedad sexual de ratas macho, los experimentos fueron los siguientes:

### *Experimento 5*

Se identificó una dosis sub-efectiva de baclofen para la reversión de la saciedad sexual

### Experimento 6

Se administró una combinación de dosis sub-efectivas de baclofen y de AEA para determinar si en conjunto revertían la saciedad sexual

### *Experimento 7*

Se administró una combinación de dosis sub-efectivas de baclofen y 2-AG para determinar si en conjunto revertían la saciedad sexual

## **Resultados.**

**Objetivo 1. Determinar si los receptores GABA<sub>A</sub> participan en la interacción de 2-AG y AEA con la transmisión GABAérgica para revertir la saciedad sexual.**

En la figura 4 se muestra una curva dosis-respuesta de la proporción de ratas sexualmente saciadas que presenta intromisiones, eyacula y reinicia la cópula después de la eyaculación) en respuesta a diferentes dosis de bicuculina (3-100 µg/kg).

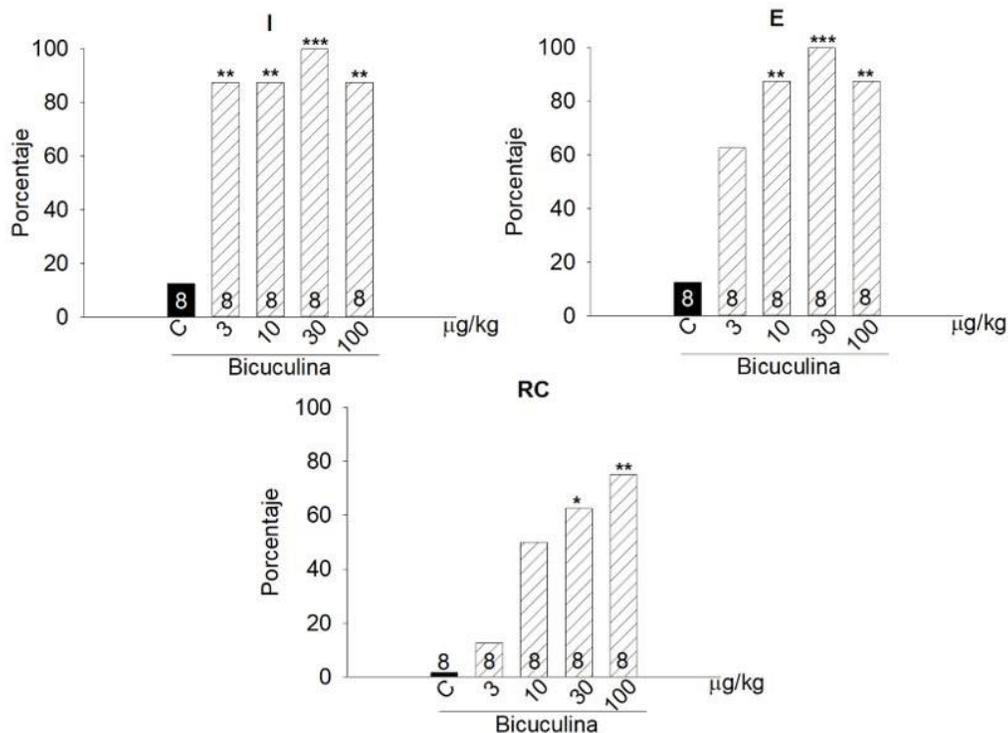


Fig.4. Curva dosis respuesta del efecto de bicuculina sobre la conducta sexual de ratas sexualmente saciadas. Se muestra el porcentaje de animales sexualmente exhaustos que intromite (I), eyacula (E) y reinicia la cópula después de la eyaculación (RC) a las 24 h post-saciedad, tras la administración de diferentes dosis de bicuculina (3-100 µg/kg). Prueba F de Fisher \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs. C.

Como se puede observar, todas las dosis de bicuculina probadas aumentan significativamente el porcentaje de animales saciados capaces de presentar intromisiones, las dosis de 10-100 µg/kg también aumentan significativamente el porcentaje de machos saciados que eyacula, pero sólo las dosis de 30 y 100 µg/kg de bicuculina aumentan significativamente el porcentaje de ratas saciadas que reinicia la cópula después de la eyaculación. Dado que el criterio para considerar que un tratamiento revierte la saciedad sexual es que éste produzca un aumento significativo en el porcentaje de machos sexualmente saciados que reinicia la cópula después de eyacular, podemos decir que las dosis de 30 y 100 µg/kg de bicuculina revierten la inhibición sexual de ratas saciadas y que las dosis de 3 y 10 µg/kg son subefectivas para la reversión de la saciedad.

En la figura 5 se muestra la proporción de animales sexualmente saciados que presenta las diferentes respuestas sexuales tras la co-administración de dosis sub-efectivas de bicuculina (3 µg/kg) y AEA (30 µg/kg) a las 24 hrs post-saciadad.

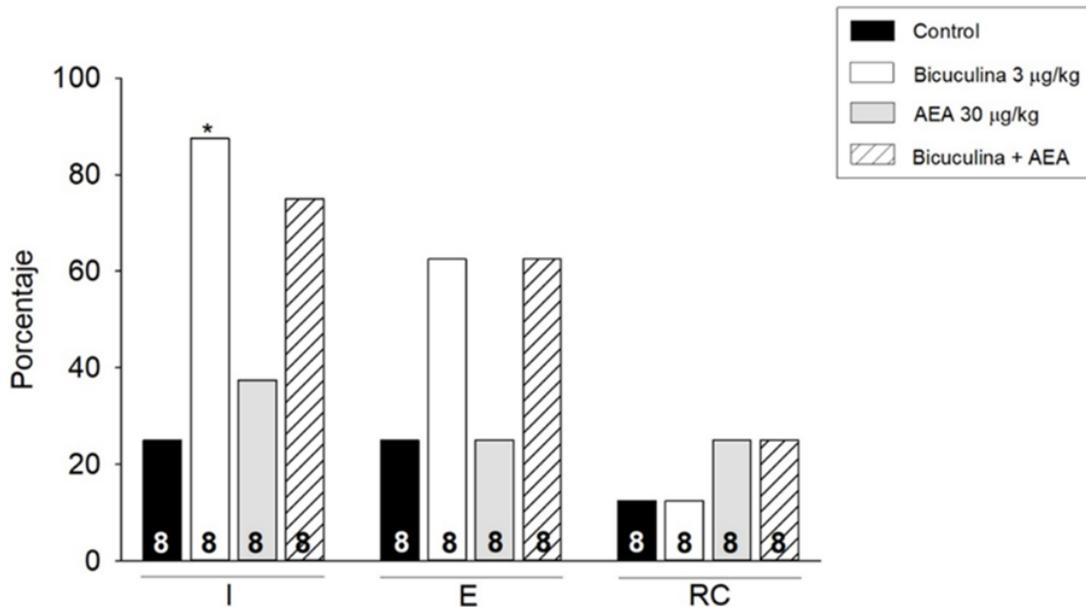


Fig. 5. Efecto de la administración de bicuculina (3 µg/kg), de AEA (30 µg/kg) y de su combinación sobre la proporción de animales sexualmente exhaustos que intromite (I), eyacula (E) y reinicia la cópula después de la eyaculación (RC) a las 24 h post-saciadad. Prueba *F* de Fisher \**P*<0.05 vs. C.

La gráfica muestra que, en respuesta al tratamiento combinado, el 75% de los animales sexualmente saciados realiza intromisiones, 62.5% animales eyacula y 25% reinicia la cópula. Estas proporciones no son significativamente distintas de las del grupo control, por lo que muestran que la AEA y la bicuculina no actúan en conjunto para revertir la inhibición sexual de las ratas macho sexualmente saciadas.

En la figura 6 se muestra la proporción de animales sexualmente saciados que presenta intromisiones, eyacula y reinicia la cópula después de la eyaculación, en respuesta a la combinación de dosis sub-efectivas de bicuculina (3 µg/kg) y 2-AG (30 µg/kg).

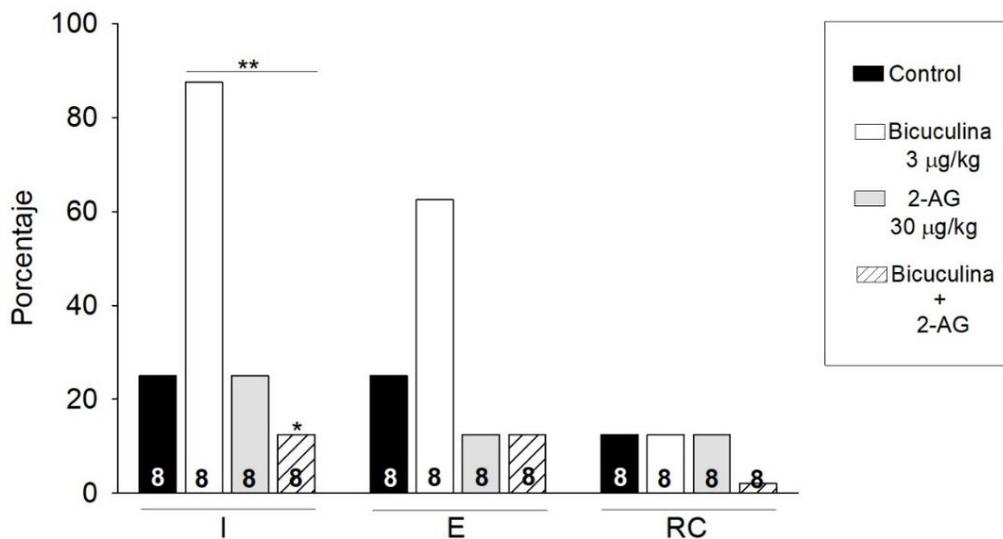


Fig. 6. Efecto de la administración de bicuculina (3 µg/kg), de 2-AG (30 µg/kg) y de su combinación sobre la proporción de animales sexualmente exhaustos que intromite (I), eyacula (E) y reinicia la cópula después de la eyaculación (RC) a las 24 h post-saciedad. Prueba *F* de Fisher \**P*<0.05, \*\**P*<0.01

En la gráfica se aprecia que la administración de bicuculina induce *per se* un aumento en la proporción de animales sexualmente saciados que presentan la conducta de intromisión que no alcanza significancia estadística, el 2-AG carece de efecto *per se* sobre la cópula de los machos saciados, y que la combinación de ambos fármacos no induce la expresión de la cópula en los animales sexualmente saciados. De hecho, hay una diferencia estadísticamente significativa en la proporción de animales que intromite producido por la bicuculina y por la combinación, indicando que el 2-AG cancela el aumento producido por bicuculina. Con el objeto de confirmar este efecto del 2-AG, se realizó un experimento con una combinación de dosis efectivas de ambos fármacos.

En la figura 7 se ilustra la proporción de machos sexualmente saciados que intromite, eyacula y reinicia la cópula tras la administración de la combinación de dosis efectivas de bicuculina (300 µg/kg) y 2-AG (300 µg/kg).

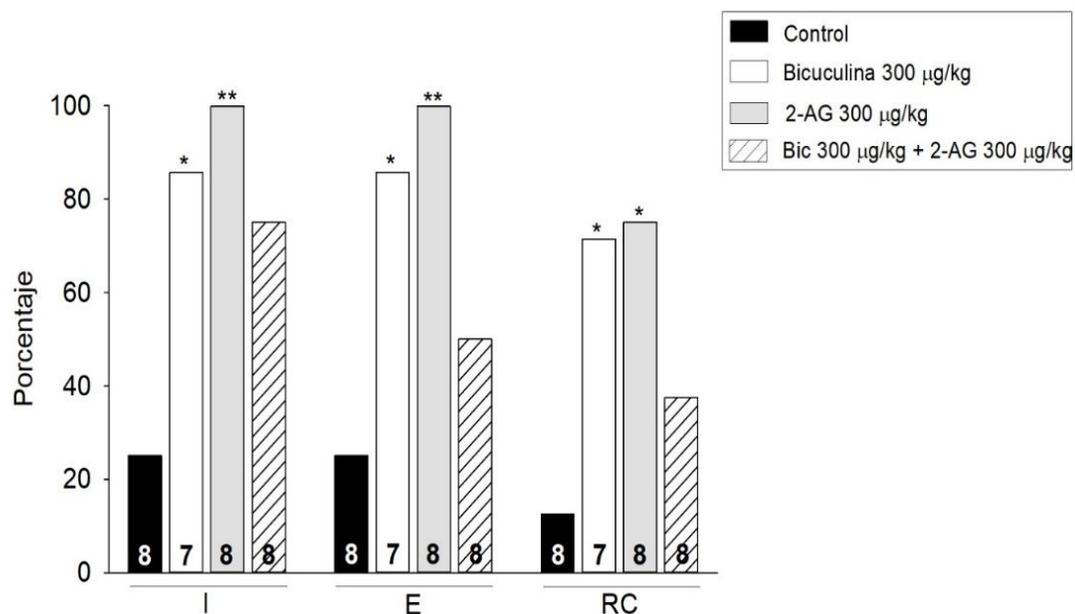


Fig. 7. Efecto de la administración de dosis efectivas de bicuculina (300 µg/kg), de 2-AG (300 µg/kg) y de su combinación sobre la proporción de animales sexualmente exhaustos que intromite (I), eyacula (E) y reinicia la cópula después de la eyaculación (RC) a las 24 h post-saciación. Prueba F de Fisher \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. C

Se aprecia que la combinación de dosis efectivas de ambos fármacos produce aumentos menores en las proporciones de ratas saciadas que presentan actividad sexual, incluyendo la proporción de animales que reinicia la cópula, cancelando así su capacidad para revertir la saciedad.

**Objetivo 2. Establecer si los receptores GABA<sub>B</sub> participan en el mantenimiento de la inhibición sexual de ratas sexualmente exhaustas.**

En la figura 8 se muestra la proporción de ratas sexualmente saciadas que presenta intromisiones, eyacula y reinicia la cópula después de la eyaculación en respuesta a la administración de diferentes dosis del agonista de receptores GABA<sub>B</sub>, baclofen (10-1000 µg/kg).

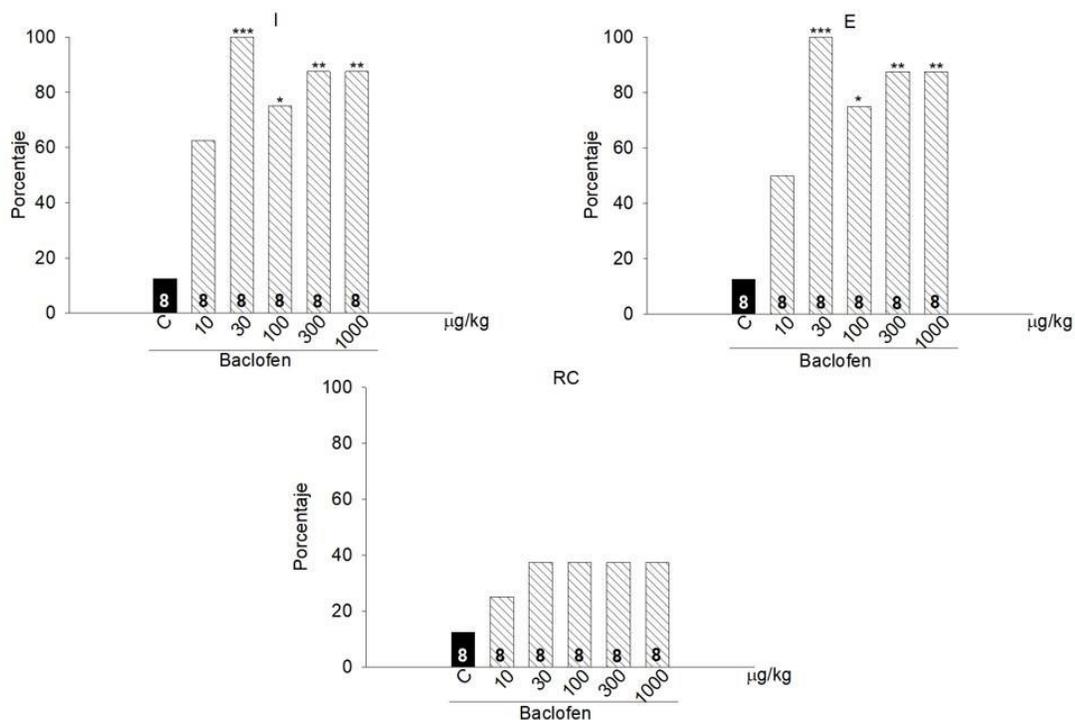


Fig. 8. Curva dosis respuesta del efecto de baclofen sobre la cópula de ratas sexualmente saciadas. Se muestra el porcentaje de ratas sexualmente exhaustas que intromite (I), eyacula (E) y reinicia la cópula tras la eyaculación (RC) a las 24 h post-saciedad, en respuesta a la administración de diferentes dosis de baclofen (10-1000 µg/kg). Prueba F de Fisher \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs. C.

Se aprecia que el porcentaje de animales saciados que intromite y eyacula aumenta significativamente con las dosis de 30-1000 µg/kg de baclofen, sin embargo, ninguna de las dosis utilizadas aumenta significativamente el porcentaje de animales que reinicia la cópula después de la eyaculación. Por lo tanto, el baclofen no revierte la saciedad sexual a ninguna de las dosis probadas.

**Objetivo 3. Determinar si los receptores GABA<sub>B</sub> participan en la interacción de 2-AG y AEA con la transmisión GABAérgica para revertir la saciedad sexual.**

En la figura 9 se muestra la proporción de animales sexualmente saciados que presenta las diferentes respuestas sexuales después de la co-administración de dosis sub-efectivas de baclofen (10 µg/kg) y 2-AG (30 µg/kg).

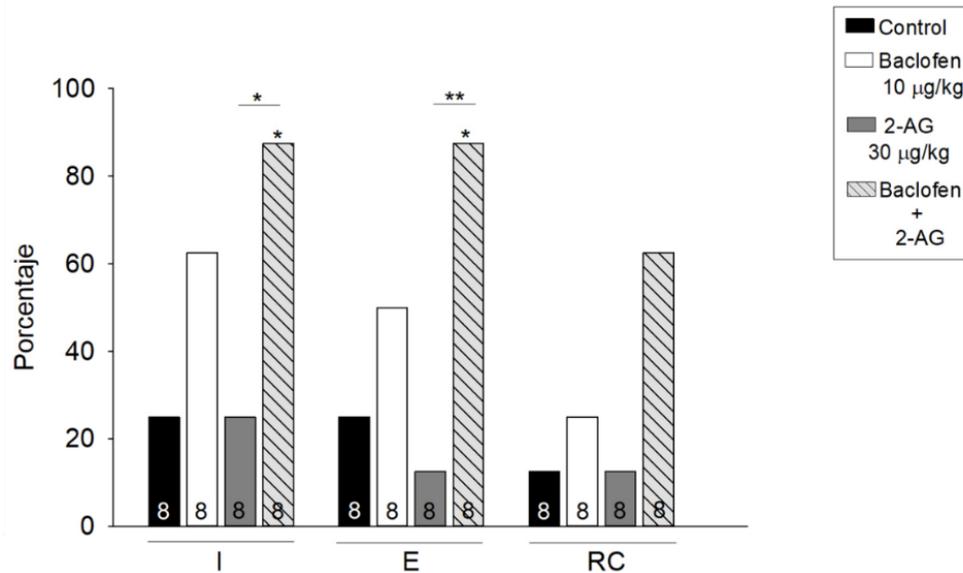


Fig. 9. Efecto de la administración de dosis subefectivas de baclofen (10 µg/kg), de 2-AG (30 µg/kg) y su combinación sobre la proporción de animales sexualmente exhaustos que intromite (I), eyacula (E) y reinicia la cópula después de la eyaculación (RC) a las 24 h post-saciación. Prueba F de Fisher \*P<0.05 vs. C; \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. 2-AG

En la gráfica se aprecia que ni baclofen, ni 2-AG inducen *per se* un incremento significativo en la proporción de machos sexualmente exhaustos que monta, intromite, eyacula y reinicia la cópula después de la eyaculación. Sin embargo, la combinación de baclofen y 2-AG produce un aumento significativo en el porcentaje de animales que intromite y eyacula, así como una clara tendencia a aumentar el porcentaje de animales que reinicia la cópula después de la eyaculación, sin que este aumento alcance significancia estadística.

En la figura 10 se muestra la proporción de animales que presenta las diferentes respuestas sexuales tras la co-administración de dosis subefectivas de baclofen (10 µg/kg) y AEA (30 µg/kg). Se observa que la dosis sub-efectiva de baclofen produce un aumento en la proporción de animales que monta, intromite y eyacula. La dosis sub-efectiva de AEA carece de efecto sobre la proporción de animales que presentan las diferentes conductas sexuales y la combinación de estos fármacos produce una tendencia a

incrementar la proporción de machos sexualmente exhaustos que monta, intromite y eyacula sin llegar a la significancia estadística comparado con el grupo control.

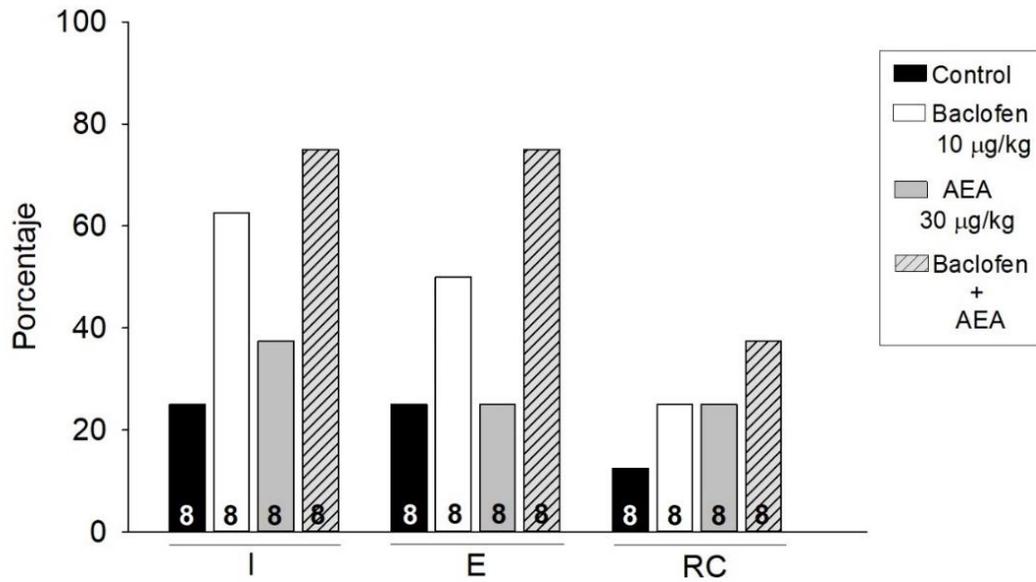


Fig. 10. Efecto de la administración de baclofen (10 µg/kg), de AEA (30 µg/kg) y de su combinación sobre la proporción de animales sexualmente exhaustos que intromite (I), eyacula (E) y reinicia la cópula después de la eyaculación (RC) a las 24 h post-saciación. Prueba *F* de Fisher, no significativa

En las tablas 2- 4 se muestran los datos de actividad ambulatoria espontánea de los animales sometidos a los distintos tratamientos farmacológicos y sus vehículos. Como se puede observar, ninguno de los tratamientos modificó significativamente la actividad locomotora de los animales sexualmente saciados al compararlos con los vehículos.

Tabla 2. Actividad ambulatoria de la curva dosis respuesta de bicuculina

Fármaco	Dosis	No. de cruces en 5 min Mediana +/- Error estándar
<b>Sol. salina</b>	0	42.75± 3.12
<b>Bicuculina</b>	3 µg/kg	51.62± 2.93
	10 µg/kg	55.87± 3.59
	30 µg/kg	56.37± 5.00

ANOVA de una vía no significativo

Tabla 3. Actividad ambulatoria de la curva dosis respuesta de baclofen

Fármaco	Dosis	No. de cruces en 5 min Mediana +/- Error estándar
<b>Sol. salina</b>	0	42.75± 3.12
<b>Baclofen</b>	10 µg/kg	51.87± 4.49
	30 µg/kg	54.62± 2.84
	100 µg/kg	45.75± 4.96
	300 µg/kg	50.75± 3.04
	1000 µg/kg	47.37± 5.39

ANOVA de una vía no significativo

Tabla 4. Actividad ambulatoria de tratamientos combinados

Fármaco	Dosis	No. de cruces en 5 min Mediana +/- Error estándar
<b>Salina+ Vehículo de 2-AG/AEA</b>	0	39.50± 3.77
<b>Bicuculina + 2-AG</b>	3 µg/kg + 30 µg/kg	48.62± 5.15
<b>Baclofen + 2-AG</b>	10 µg/kg + 30 µg/kg	32.62± 4.04
<b>Bicuculina + AEA</b>	3 µg/kg + 30 µg/kg	37.87± 4.49
<b>Baclofen + AEA</b>	10 µg/kg + 30 µg/kg	45.87± 2.16

ANOVA de una vía no significativo

## Discusión

Esta investigación tuvo como objetivo establecer la posible interacción entre el sistema GABAérgico y el sistema endocannabinoide en la reversión farmacológica de la inhibición sexual que caracteriza a las ratas sexualmente saciadas, así como determinar la posible participación de los receptores GABA<sub>B</sub> en el mantenimiento de la inhibición sexual mediado por la transmisión GABAérgica.

Los resultados obtenidos se resumen a continuación:

- El antagonista de receptores GABA<sub>A</sub>, bicuculina, no actuó en conjunto con los eCBs 2-AG y AEA para revertir la saciedad sexual.
- 2-AG bloquea los efectos facilitadores de bicuculina sobre la conducta sexual de ratas macho saciadas.
- El agonista de receptores GABA<sub>B</sub>, baclofen, aumentó la proporción de animales sexualmente saciados que presentó actividad sexual, pero no la proporción de los que reiniciaron la cópula, por lo que no revierte la saciedad sexual.
- La combinación de baclofen con 2-AG produjo una clara tendencia a incrementar el número de animales saciados que reinició la cópula
- La combinación de baclofen con AEA no produjo cambios en la conducta sexual de las ratas macho sexualmente saciadas.

El circuito MSL, cuyas neuronas surgen en el ATV y proyectan al NAcc, juega un papel central en la expresión de la conducta sexual masculina de ratas (Everitt, 1990; Hull & Rodríguez-Manzo, 2017; Melis & Argiolas 1995). La actividad basal de las neuronas DAérgicas de este circuito está regulada por la transmisión GABAérgica en el ATV, que ejerce un tono inhibitorio sobre ellas. Ante la presencia de un estímulo recompensante, este tono inhibitorio disminuye permitiendo que, en conjunto con la activación de la señalización glutamatérgica en el ATV (Grace et al., 2007) aumente la actividad de las neuronas DAérgicas, generando un disparo en ráfaga que da lugar a una

liberación fásica de DA incrementando su concentración en el NAcc (Covey et al., 2017; Grace, 1991).

El NAcc actúa como un filtro de estímulos asociados a eventos motivacionalmente relevantes para estimular el inicio y mantenimiento de conductas de acercamiento a estímulos recompensantes o de evitación de estímulos aversivos (Covey & Yocky, 2021). Se ha descrito que el circuito ATV-NAcc es relevante para el fenómeno de la saciedad sexual, ya que intervenciones farmacológicas dentro de éste pueden revertir la inhibición sexual característica de los machos saciados a las 24 h post-saciedad. Así, el antagonista de receptores opioides  $\mu$  y  $\delta$ , naltrexona, revierte la saciedad sexual tras su administración intra-ATV, indicando la presencia de un tono opioidérgico en esta región que participa en la inhibición de la conducta sexual en las ratas sexualmente saciadas (Garduño-Gutiérrez et al., 2013). Así mismo, la transmisión GABAérgica en esta región participa en el mantenimiento de la inhibición sexual de las ratas sexualmente saciadas, ya que la administración intra-ATV del antagonista de receptores GABA<sub>A</sub>, bicuculina, también revierte la inhibición sexual en los machos sexualmente saciados (Rodríguez-Manzo & Canseco-Alba, 2017). Además de la transmisión GABAérgica, la transmisión glutamatérgica también participa en el mantenimiento de la saciedad sexual, ya que la administración sistémica de antagonistas de los receptores glutamatérgicos AMPA, NMDA y mGluR5 revierte la inhibición sexual que la caracteriza (Rodríguez-Manzo, 2015).

Estudios de nuestro laboratorio demostraron que el eCB AEA, revierte la inhibición sexual de ratas macho sexualmente saciadas al ser administrado tanto por vía sistémica como intra-ATV (Canseco-Alba & Rodríguez-Manzo, 2014; 2016) y este mismo efecto se obtuvo con la administración sistémica del eCB 2-AG (Canseco-Alba & Rodríguez-Manzo, 2019). Por otro lado, los antagonistas de los receptores NMDA y mGluR5 interactúan con los eCB, AEA y 2-AG para revertir la inhibición sexual y la reversión producida por la administración sistémica de 2-AG, es cancelada por la administración intra-ATV de un agonista de receptores mGluR5 (Hernández, 2017, tesis de

maestría). En conjunto, estos datos indican que los neurotransmisores involucrados en la regulación de la actividad de las neuronas DAérgicas en el ATV, i.e. GABA, glutamato, eCBs y opioides endógenos, están involucrados en la regulación de la inhibición sexual de machos sexualmente saciados y que los eCBs interactúan con la transmisión glutamatérgica para revertir esa inhibición sexual.

En este trabajo se evaluó la participación de los receptores GABA<sub>B</sub> en los efectos de la transmisión GABAérgica sobre el fenómeno de saciedad sexual, así como la posible interacción de los efectos de los eCB con los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> para la reversión de la inhibición sexual que la caracteriza.

#### Participación del receptor GABA<sub>B</sub> en el fenómeno de saciedad sexual

La participación de los receptores GABA<sub>B</sub> en el mantenimiento de la inhibición sexual producido por la transmisión GABAérgica se exploró con la administración del agonista de estos receptores baclofen, a los animales sexualmente saciados. La activación de los receptores GABA<sub>B</sub> produjo un incremento significativo de la proporción de machos sexualmente saciados que eyaculó con la mayoría de las dosis probadas, sin embargo, no revirtió la inhibición sexual pues no aumentó el porcentaje de animales saciados que reinició la cópula tras la eyaculación. Este resultado indica que la activación de los receptores GABA<sub>B</sub> mediante su agonista, baclofen, no participa en el mantenimiento de la inhibición sexual de larga duración, mediado por GABA. De manera contrastante, en estudios con animales sexualmente expertos, se ha descrito que el baclofen inhibe casi por completo la conducta sexual de ratas macho, a una dosis de 2.5 mg/kg (Agmo y Paredes, 1985; Paredes y Agmo, 1989) por lo que a futuro habrá de estudiarse el efecto de un antagonista de los receptores GABA<sub>B</sub>. En el ATV, los receptores GABA<sub>B</sub> se expresan en las terminales GABAérgicas donde actúan como autorreceptores, por lo que su activación inhibe el tono GABAérgico que mantiene a las neuronas DAérgicas con una actividad basal, favoreciendo el aumento de su

actividad de estas neuronas DAérgicas (Xi & Stein, 1998; Heaney & Kinney, 2016). Por otro lado, los receptores GABA<sub>B</sub> también se expresan post-sinápticamente, en los somas de las neuronas DAérgicas y su activación las hiperpolariza (Xi & Stein, 1998). Se ha descrito que el tipo de receptores GABA<sub>B</sub> que se activa en el ATV puede depender de la dosis de agonista administrada, ya que dosis bajas activan a los receptores presinápticos, mientras que dosis altas activan tanto a los receptores presinápticos como a los postsinápticos (Cruz et al., 2004).

El hecho de que en nuestros experimentos el baclofen haya tenido efectos facilitadores y no inhibitorios sobre la expresión de la conducta sexual de las ratas sexualmente saciadas puede estar relacionado con el rango de dosis de baclofen utilizadas.

Si bien en nuestra investigación el agonista de receptores GABA<sub>B</sub> se administró por vía sistémica, existe evidencia de que la transmisión GABAérgica en el MSL, en particular en el ATV, participa en el mantenimiento de la inhibición sexual de ratas saciadas. Por ello, se podría pensar que el aumento en la actividad sexual de los machos sexualmente saciados producido por dosis bajas de baclofen (0.03-1 mg/kg) fuera resultado de la activación de receptores presinápticos del ATV, que favorecerían un aumento en la actividad de las neuronas DAérgicas que, sin embargo, no fuera suficiente para revertir la saciedad sexual.

En el NAcc, los receptores GABA<sub>B</sub> se expresan tanto en las terminales DAérgicas (Covey & Yocky, 2021) como glutamatérgicas (Manz et al., 2019) y su activación inhibe la liberación del neurotransmisor, lo que da por resultado la disminución de la liberación de DA en el NAcc, de forma directa e indirecta, respectivamente (Covey & Yocky, 2021). Es posible que la activación de estos receptores GABA<sub>B</sub> presinápticos en el NAcc contribuya a contrarrestar el aumento en la actividad DAérgica mediado por la activación de los receptores GABA<sub>B</sub> del ATV, dando por resultado un aumento moderado en la liberación de DA que permita la facilitación de la cópula hasta la eyaculación, pero no sea suficiente para revertir la saciedad sexual.

En este trabajo se identificó una dosis de bicuculina sub-efectiva para revertir la saciedad sexual, que por sí sola produjo un aumento significativo en la proporción de animales sexualmente saciados que presentó conductas de monta e intromisión a las 24 h post-saciedad, sin modificar la proporción de los que eyacularon. Este resultado sugiere que esta dosis de bicuculina aumenta la motivación sexual, que en los machos sexualmente saciados está disminuida (Guadarrama-Bazante & Rodríguez-Manzo, 2019; Canseco-Alba & Rodríguez-Manzo, 2019), pero no revierte la inhibición sexual. Estos resultados, en conjunto con el hecho de que a dosis mayores la bicuculina revierte la saciedad sexual por sí misma (Rodríguez-Manzo & Canseco-Alba, 2017), indica que la participación de la transmisión GABAérgica en el mantenimiento de la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas está mediada principalmente por sus acciones sobre el receptor GABA<sub>A</sub>, facilitando el componente motivacional de la conducta sexual masculina.

### **Interacción de bicuculina con los eCB AEA y 2-AG**

Debido a la distribución anatómica reportada para el CB1R en el circuito MSL, específicamente su localización en las terminales GABAérgicas del ATV, la existencia de una interacción entre los efectos de los eCBs y la transmisión GABAérgica era probable, tanto a través de los receptores GABA<sub>A</sub> localizados en las neuronas DAérgicas (Engin et al., 2018; Ciccarelli et al., 2012), como de los receptores GABA<sub>B</sub>, que se expresan a nivel presináptico en las terminales GABAérgicas del ATV (Cruz et al., 2004; Ciccarelli et al., 2012; Kasten & Boehm, 2015), así como en los somas de las neuronas DAérgicas y no DAérgicas (Ciccarelli et al., 2012).

Nuestros resultados muestran que combinaciones de dosis sub-efectivas de bicuculina y de los eCBs AEA o 2-AG no actuaron en conjunto para revertir la saciedad sexual. Más aún, el 2-AG canceló los efectos facilitadores sobre la motivación sexual producidos por dosis sub-efectivas y efectivas de bicuculina en los machos sexualmente saciados. Una interacción similar se reportó en pollos en los que la administración de 2-AG les indujo un

incremento en el apetito; sin embargo, cuando se coadministró una dosis baja del antagonista de receptores GABA<sub>A</sub> picrotoxina, la hiperfagia inducida por 2-AG se bloqueó (Zendehdel et al., 2017). Estos datos sugieren que los efectos del 2-AG y de antagonistas de receptores GABA<sub>A</sub> se contrarrestan. La combinación con AEA, en cambio, careció de efecto y no modificó las acciones de la dosis sub-efectiva de bicuculina.

En conjunto, nuestros resultados muestran, por un lado, que el efecto de ambos eCBs de inhibir la liberación de GABA de sus terminales, no se suma al efecto del bloqueo de receptores GABA<sub>A</sub> postsinápticos para inducir la reversión de la saciedad sexual y, por otro, que la AEA y el 2-AG no actúan de la misma manera. Este último dato coincide con el hallazgo previo de que el 2-AG interactúa con la DA para revertir la saciedad sexual a través de la activación de receptores D2-like, mientras que la AEA lo hace principalmente a través de la activación de receptores D1-like (Canseco-Alba & Rodríguez-Manzo, 2019), mostrando que estos dos eCBs no comparten un mismo mecanismo de acción.

Por otro lado, se ha reportado que los eCBs pueden actuar como moduladores alostéricos positivos de la familia de canales iónicos activados por ligando “cys-loop”, dentro de los que se encuentran los receptores GABA<sub>A</sub> (Zhang & Xiong, 2009; Sigel et al. 2011; Bakas et al., 2017; Baur et al., 2013). Estudios electrofisiológicos mostraron que el 2-AG se une a un sitio alostérico en las subunidades  $\beta 2$  de los receptores GABA<sub>A</sub> y es capaz de incrementar la amplitud de las corrientes inhibitorias postsinápticas (IPSC) de estos receptores expresados en oocitos de *Xenopus*. Este efecto se observó a concentraciones bajas de GABA. La AEA también posee actividad como modulador alostérico positivo del receptor GABA<sub>A</sub>, sin embargo, esta actividad es de menor magnitud que la del 2-AG (Sigel et al., 2011; Golovko et al., 2015).

Esta investigación involucró administraciones sistémicas de eCBs y de bicuculina, por lo que no se pueden hacer aseveraciones sobre el efecto de los fármacos en un área específica del SNC. Sin embargo, la evidencia existente indica que el MSL es de gran relevancia para el fenómeno de

saciedad sexual (Rodríguez-Manzo, 1999; Garduño-Gutiérrez et al., 2013; Guadarrama-Bazante & Rodríguez-Manzo, 2019; Rodríguez-Manzo & Canseco-Alba, 2017) y se ha demostrado que la reversión de la inhibición sexual de machos saciados mediada por el eCB AEA, como la mediada por bicuculina administradas por vía sistémica, se reproduce tras la administración de estos fármacos directamente en el ATV (Rodríguez-Manzo & Canseco Alba, 2015; Canseco-Alba & Rodríguez Manzo, 2016). Estos datos nos permiten pensar que los efectos de estos fármacos sobre la saciedad sexual pudieran tener lugar en el MSL.

En el NAcc, la subunidad  $\beta 2$  del receptor GABA<sub>A</sub> se expresa, predominantemente en neuronas de tamaño mediano e interneuronas, sin que se haya identificado su naturaleza neuroquímica, y en el ATV se encontró esta subunidad en dendritas y axones, aunque en menor cantidad (Schwarzer et al., 2001). No se ha reportado la expresión de la subunidad  $\beta 2$  del receptor GABA<sub>A</sub> en las neuronas dopaminérgicas del ATV, ni en sus terminales en el NAcc (Schwarzer et al., 2001; Okada et al., 2004).

Por otro lado, se ha reportado que 2-AG y AEA también pueden modular la actividad de los receptores GABA<sub>A</sub>, independientemente del CB1R, y de manera dependiente de las concentraciones de GABA. A concentraciones bajas de GABA, los eCBs incrementan las corrientes de cloruro, mientras que a concentraciones altas de GABA, las reducen (Golovko et al., 2015). Por lo tanto, podría pensarse que dosis sub-efectivas de 2-AG y de AEA, además de bloquear parcialmente la liberación de GABA en las terminales, podrían incrementar las corrientes inhibitorias de los receptores GABA<sub>A</sub> postsinápticos que no hayan sido bloqueados por la dosis sub-efectiva de bicuculina, un efecto que pudiera contrarrestar el bloqueo de las acciones GABAérgicas.

Además, también habría que contemplar la posible participación de los CB2R en las acciones mediadas por los eCBs, ya que se ha reportado la expresión de CB2R en las terminales DAérgicas del NAcc y del ARNm del CB2R en las neuronas DAérgicas del ATV de ratas, y que la administración intra-NAcc de agonistas de CB2R disminuye las concentraciones de DA

(Covey et al., 2021; Zhang et al., 2014; Zhang et al., 2017). Sin embargo, los datos obtenidos en esta investigación no nos permiten establecer un mecanismo para explicar la falta de interacción entre el antagonista GABA<sub>A</sub> y los eCBs para la reversión de la saciedad sexual.

Se requiere profundizar en la investigación acerca de la interacción entre los eCBs y la transmisión GABAérgica mediada por el receptor GABA<sub>A</sub> en el MSL.

### **Interacción entre baclofen y los eCB AEA y 2-AG**

La co-administración de dosis sub-efectivas del agonista de receptores GABA<sub>B</sub> baclofen y del eCB 2-AG produjo un incremento significativo en la proporción de animales sexualmente saciados que eyaculó, así como un incremento importante en el porcentaje de animales que reinició la cópula después de la eyaculación, que no alcanzó significancia estadística. Estos datos sugieren que los efectos de la activación de receptores GABA<sub>B</sub>, sumados a la inhibición parcial de la liberación de GABA producida por el 2-AG al activar a los CB1R de las terminales GABAérgicas, podrían sumarse para facilitar la expresión de la conducta sexual en las ratas sexualmente saciadas.

La co-administración de AEA con baclofen también presentó una tendencia a incrementar la proporción de animales sexualmente saciados que presenta actividad sexual, sin embargo, este incremento fue de menor magnitud que el obtenido con 2-AG y baclofen. Además, la combinación de AEA y baclofen no aumentó la proporción de machos saciados que reinició la cópula. Estos datos muestran nuevamente que el 2-AG y la AEA tienen efectos distintos.

Los efectos sexuales que se obtuvieron con la combinación de los eCBs y el agonista de receptores GABA<sub>B</sub> pudieran ocurrir en el ATV, ya que se ha reportado la presencia de CB1R (Covey et al. 2017) y de receptores GABA<sub>B</sub> en esta región cerebral (Ciccarelli et al., 2012). Por otro lado, se ha demostrado que tanto los eCBs como la bicuculina revierten la inhibición sexual cuando son administrados en el ATV (Rodríguez-Manzo & Canseco Alba, 2015; 2017;

Canseco-Alba & Rodríguez Manzo, 2016). La explicación de los efectos de estas combinaciones en las ratas sexualmente saciadas no es fácil, puesto que la regulación GABAérgica en el ATV es compleja.

En esta región cerebral, los receptores GABA<sub>B</sub> se localizan en las terminales GABAérgicas, donde funcionan como autorreceptores que inhiben la liberación de GABA, así como en los somas de las interneuronas GABAérgicas y de las neuronas DAérgicas, cuya activación inhibe la actividad neuronal (Ciccarelli et al., 2012). Se ha descrito que en el ATV hay mayor expresión de receptores GABA<sub>B</sub> presinápticos que postsinápticos, cuya activación puede disminuir el tono GABAérgico, desinhibiendo a las neuronas DAérgicas. Los CB1R, como ya se mencionó, se expresan también en las terminales glutamatérgicas en el ATV (Covey et al., 2017).

La activación parcial de los CB1Rs en las terminales GABAérgicas del ATV inhibiría parcialmente la liberación de GABA y este efecto podría sumarse a la inhibición parcial de la liberación de este neurotransmisor producida por la activación de autorreceptores GABA<sub>B</sub> en la misma terminal. Estos efectos sumados probablemente inhibirían por completo la liberación de GABA, lo que daría por resultado un aumento en la actividad de las neuronas DAérgicas con el consecuente aumento de DA en el NAcc, que podría ser el mecanismo responsable de la reversión de la saciedad producida por dosis efectivas, tanto de los eCBs como del antagonista de receptores GABA<sub>A</sub> bicuculina. Sin embargo, la activación parcial de los receptores GABA<sub>B</sub> postsinápticos en las neuronas DAérgicas y en las interneuronas GABAérgicas, tendría efectos opuestos sobre la actividad de las neuronas DAérgicas. Por un lado, inhibiría parcialmente a las interneuronas GABAérgicas reduciendo la inhibición que éstas ejercen sobre las neuronas DAérgicas, pero este efecto sería contrarrestado por la activación parcial de los receptores GABA<sub>B</sub> en las propias neuronas DAérgicas, que reduciría directamente su actividad. Por lo tanto, los efectos de la activación parcial conjunta de receptores GABA<sub>B</sub> y CB1R en el ATV sobre la actividad sexual de ratas sexualmente saciadas posiblemente

dependan del resultado neto que producen sus agonistas sobre la actividad de las neuronas DAérgicas.

Podría proponerse que el aumento en la liberación de DA producido por el conjunto de acciones resultante de la activación parcial de receptores GABA<sub>B</sub> y CB1R en el ATV es suficiente para facilitar la expresión de la conducta sexual en estos animales, pero no suficiente para revertir la inhibición sexual. Sin embargo, también se ha reportado la presencia de receptores GABA<sub>B</sub> en el NAcc, tanto en las interneuronas GABAérgicas del tipo FSI como en las terminales de las neuronas glutamatérgicas y DAérgicas (Covey et al., 2021), así como la expresión de CB2R en las terminales de las neuronas DA del NAcc, cuya activación inhibe la liberación de DA (Covey et al., 2021; Zhang et al., 2014; Zhang et al., 2017). La activación de estos receptores en el NAcc pudo haber contrarrestado parcialmente el aumento en la liberación de DA producido en el ATV, evitando que la estimulación fuera suficiente para que los animales saciados reiniciaran la cópula después de la eyaculación.

Por otro lado, también hay evidencia de interacciones entre los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub>. En el estudio de Brodник y colaboradores del 2019 se describió que diazepam, un modulador alostérico positivo del receptor GABA<sub>A</sub>, administrado intra-NAcc en presencia de concentraciones bajas de GABA, es capaz de reducir la liberación de DA en el NAcc, efecto que es bloqueado por un antagonista del receptor GABA<sub>A</sub> que se une al sitio alostérico de benzodiazepinas, el flumazenil. De forma similar, la administración del agonista de receptores GABA<sub>A</sub>, muscimol, reduce la liberación de DA en el NAcc, efecto que es bloqueado por bicuculina. Cabe mencionar que la bicuculina por sí sola no tuvo efecto sobre la liberación de DA en el NAcc. De manera interesante, y de importancia para este estudio, los efectos producidos por diazepam y muscimol fueron bloqueados por un antagonista de los receptores GABA<sub>B</sub>, el CGP 55845, indicando que existe interacción entre los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> en el NAcc para la modulación de la liberación de DA (Brodnik et al., 2019).

En esta investigación utilizamos una combinación de un agonista GABA<sub>B</sub>, con los eCBs AEA o 2-AG, que como ya se mencionó, también actúan como moduladores alostéricos positivos del receptor GABA<sub>A</sub>, por lo que la activación de los receptores GABA<sub>B</sub> sumada a la modulación alostérica positiva del 2-AG sobre receptores GABA<sub>A</sub> pudiera también disminuir la liberación de DA en el NAcc, explicando en parte por qué la combinación de 2-AG y baclofen no llegó a revertir la saciedad sexual.

Se requiere profundizar en la investigación de las interacciones entre la transmisión GABAérgica y endocannabinoide, especialmente a través de administraciones intracerebrales de los fármacos utilizados en este trabajo, para poder dilucidar su posible interacción en el MSL para la reversión de la saciedad sexual.

Los resultados distintos obtenidos con las combinaciones de cada uno de los eCBs con bicuculina o con baclofen muestran que, a pesar de que ambos eCB activan al CB1R, no actúan por el mismo mecanismo para revertir la saciedad sexual.

## **Conclusiones**

- a) AEA no interactúa con bicuculina ni baclofen para revertir la saciedad sexual
- b) El 2-AG bloquea los efectos facilitadores de bicuculina sobre la conducta sexual de ratas sexualmente saciadas y favorece los de baclofen
- c) Los receptores GABA<sub>B</sub> no participan en los efectos del GABA para mantener la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas
- d) AEA y 2-AG, a pesar de activar ambos a los receptores CB1, parecen no actuar por el mismo mecanismo para revertir la saciedad sexual

## **Perspectivas**

- a) Determinar el efecto del antagonista GABA<sub>B</sub>, baclofen, en el fenómeno de saciedad sexual de ratas macho

- b) Determinar la participación del antagonista GABA<sub>B</sub>, faclofen, en la reversión de la saciedad sexual mediada por los eCB AEA y 2-AG
- c) Determinar si existe participación de los receptores GABA<sub>A</sub> del NAcc en el mantenimiento del fenómeno de la saciedad sexual de ratas macho.
- d) Establecer la posible participación de los receptores GABA<sub>B</sub> del ATV y del NAcc en el fenómeno de saciedad sexual de ratas macho
- e) Determinar mediante el uso de herramientas farmacológicas la participación del receptor CB2R en el fenómeno de saciedad sexual
- f) Valorar una posible interacción entre los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> en el circuito mesolímbico en el fenómeno de la saciedad sexual

## Bibliografía.

1. Adermark, L., & Lovinger, D. M. (2007). Retrograde endocannabinoid signaling at striatal synapses requires a regulated postsynaptic release step. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(51), 20564–20569. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706873104>
2. Adinoff, B. (2004). Neurobiologic processes in drug reward and addiction. *Harv Rev Psychiatry*, *12*(6), 305–320. <https://doi.org/10.1080/10673220490910844>
3. Agmo, A., & Fernández, H. (1991). Benzodiazepine receptor ligands and sexual behavior in the male rat: the role of GABAergic mechanisms. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, *38*(4), 781–788. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(91\)90242-t](https://doi.org/10.1016/0091-3057(91)90242-t)
4. Agmo, A., & Paredes, R. (1985). GABAergic drugs and sexual behaviour in the male rat. *European journal of pharmacology*, *112*(3), 371–378. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(85\)90783-6](https://doi.org/10.1016/0014-2999(85)90783-6)
5. Agmo, A., Paredes, R. G., Sierra, L., & Garcés, I. (1997). The inhibitory effects on sexual behavior and ambulatory activity of the mixed GABAA/GABAB agonist progabide are differentially blocked by GABA receptor antagonists. *Psychopharmacology*, *129*(1), 27–34. <https://doi.org/10.1007/s002130050158>
6. Ahlenius, S., & Larsson, K. (1984). Apomorphine and haloperidol-induced effects on male rat sexual behavior: no evidence for actions due to stimulation of central dopamine autoreceptors. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, *21*(3), 463–466. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(84\)80111-2](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(84)80111-2)
7. Arias-Carrián, O., Stamelou, M., Murillo-Rodríguez, E., Menéndez-Gonzalez, M., & Pöppel, E. (2010). Dopaminergic reward system: A short integrative review. *International Archives of Medicine*, *3*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1755-7682-3-24>

8. Atwood, B. K., & Mackie, K. (2010). CB 2: A cannabinoid receptor with an identity crisis. *British Journal of Pharmacology*, *160*, 467–479. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00729.x>
9. Baik, J. (2013). Dopamine signaling in reward-related behaviors, *7*(October), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00152>
10. Bakas, T., van Nieuwenhuijzen, P. S., Devenish, S. O., McGregor, I. S., Arnold, J. C., & Chebib, M. (2017). The direct actions of cannabidiol and 2-arachidonoyl glycerol at GABA<sub>A</sub> receptors. *Pharmacological research*, *119*, 358–370. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.02.022>
11. Balfour, M. E., Yu, L., & Coolen, L. M. (2004). Sexual behavior and sex-associated environmental cues activate the mesolimbic system in male rats. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *29*(4), 718–730. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300350>
12. Baur, R., Kielar, M., Richter, L., Ernst, M., Ecker, G. F., & Sigel, E. (2013). Molecular analysis of the site for 2-arachidonoylglycerol (2-AG) on the  $\beta_2$  subunit of GABA(A) receptors. *Journal of neurochemistry*, *126*(1), 29–36. <https://doi.org/10.1111/jnc.12270>
13. Beach, F. A., Jordan L. (1956) Sexual Exhaustion and Recovery in the Male Rat. *Quarterly Journal of Experimental Psychology*. *8*(3):121-133. doi:10.1080/17470215608416811.
14. Bischoff, S., Leonhard, S., Reymann N., Schulet V., Shigemoto R., Kaupmann K. & Bettler B. (1999). Spatial distribution of GABA<sub>BR1</sub> receptor mRNA and binding sites in the rat brain. *The journal of comparative Neurology*, *412*(1), 1-16.
15. Bouarab, C., Thompson, B., & Polter, A. M. (2019). VTA GABA Neurons at the Interface of Stress and Reward. *Frontiers in Neural Circuits*, *13*(December), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fncir.2019.00078>
16. Bourdy, R., & Barrot, M. (2012). A new control center for dopaminergic systems: Pulling the VTA by the tail. *Trends in Neurosciences*, *35*(11), 681–690. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.06.007>

17. Britt, J. P., Benaliouad, F., McDevitt, R. A., Stuber, G. D., Wise, R. A., & Bonci, A. (2012). Synaptic and behavioral profile of multiple glutamatergic inputs to the nucleus accumbens. *Neuron*, *76*(4), 790–803. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.040>
18. Brodnik, Z. D., Batra, A., Oleson, E. B., & España, R. A. (2019). Local GABA<sub>A</sub> Receptor-Mediated Suppression of Dopamine Release within the Nucleus Accumbens. *ACS chemical neuroscience*, *10*(4), 1978–1985. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.8b00268>
19. Canseco-Alba, A., & Rodríguez-Manzo, G. (2014). Low anandamide doses facilitate male rat sexual behaviour through the activation of CB1 receptors. *Psychopharmacology*, *231*(20), 4071–4080. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3547-9>
20. Canseco-Alba, A., & Rodríguez-Manzo, G. (2016). Intra-VTA anandamide infusion produces dose-based biphasic effects on male rat sexual behavior expression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *150–151*, 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2016.11.004>
21. 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*(August), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00184>
22. Chebib, M. (2004). GABAC receptor ion channels. In *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2004.04083.x>
23. Ciccarelli, A., Calza, A., Panzanelli, P., Concas, A., Giustetto, M., Sassoè-Pognetto, M. (2012). Organization of GABAergic Synaptic Circuits in the Rat Ventral Tegmental Area. *PLoS ONE* *7*(10): e46250. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046250>
24. Covey, D. P., Mateo, Y., Sulzer, D., Cheer, J. F., & Lovinger, D. M. (2017). Endocannabinoid modulation of dopamine neurotransmission.

*Neuropharmacology*, 124, 52–61.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.04.033>

25. Covey, D. P., & Yocky, A. G. (2021). Endocannabinoid Modulation of Nucleus Accumbens Microcircuitry and Terminal Dopamine Release. *Frontiers in synaptic neuroscience*, 13, 734975. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2021.734975>
26. Creed, M. C., Ntamati, N. R., & Tan, K. R. (2014). VTA GABA neurons modulate specific learning behaviors through the control of dopamine and cholinergic systems. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8(JAN), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00008>
27. Cruz, H. G., Ivanova, T., Lunn, M. L., Stoffel, M., Slesinger, P. A., & Lüscher, C. (2004). Bi-directional effects of GABA(B) receptor agonists on the mesolimbic dopamine system. *Nature neuroscience*, 7(2), 153–159. <https://doi.org/10.1038/nn1181>
28. Devane, W. A., & Hanus, L. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258(5090), 1946. [https://doi-org.access.biblioteca.cinvestav.mx/10.1126/science.1470919](https://doi.org/access.biblioteca.cinvestav.mx/10.1126/science.1470919)
29. Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T., & De Petrocellis, L. (1998). Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends in neurosciences*, 21(12), 521–528. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(98\)01283-1](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(98)01283-1)
30. Di Marzo, V., Bifulco, M., & De Petrocellis, L. (2004). The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nature reviews. Drug discovery*, 3(9), 771–784. <https://doi.org/10.1038/nrd1495>
31. Dobi, A., Margolis, E. B., Wang, H. L., Harvey, B. K., & Morales, M. (2010). Glutamatergic and nonglutamatergic neurons of the ventral tegmental area establish local synaptic contacts with dopaminergic and nondopaminergic neurons. *Journal of Neuroscience*. 30(1), 218–229. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3884-09.2010>

32. Engin, E., Benham, R. S., & Rudolph, U. (2018). An Emerging Circuit Pharmacology of GABA<sub>A</sub> Receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 39(8), 710–732. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.04.003>
33. Everitt B. J. (1990). Sexual motivation: a neural and behavioural analysis of the mechanisms underlying appetitive and copulatory responses of male rats. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 14(2), 217–232. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(05\)80222-2](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(05)80222-2)
34. Felder, C. C., Joyce, K. E., Briley, E. M., Mansouri, J., Mackie, K., Blond, O., Lai, Y., Ma, A. L., & Mitchell, R. L. (1995). Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Molecular pharmacology*, 48(3), 443–450.
35. Fernández-Guasti, A., Larsson, K., & Beyer, C. (1985). Comparison of the effects of different isomers of bicuculline infused in the preoptic area on male rat sexual behavior. *Experientia*, 41(11), 1414–1416. <https://doi.org/10.1007/BF01950011>
36. <sup>a</sup>Fernandez-Guasti, A., Larsson, K., & Beyer, C. (1986). Effect of bicuculline on sexual activity in castrated male rats. *Physiology & behavior*, 36(2), 235–237. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(86\)90009-0](https://doi.org/10.1016/0031-9384(86)90009-0)
37. <sup>b</sup>Fernández-Guasti, A., Larsson, K., & Beyer, C. (1986). GABAergic control of masculine sexual behavior. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 24(4), 1065–1070. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(86\)90456-9](https://doi.org/10.1016/0091-3057(86)90456-9)
38. <sup>c</sup>Fernández-Guasti, A., Larsson, K., & Vega-Sanabria, J. (1986). Depression of postejaculatory ultrasonic vocalization by (+)-bicuculline. *Behavioural brain research*, 19(1), 35–39. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(86\)90045-8](https://doi.org/10.1016/0166-4328(86)90045-8)
39. Fitzgerald, M. L., Shobin, E., & Pickel, V. M. (2012). Cannabinoid modulation of the dopaminergic circuitry: implications for limbic and striatal output. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 38(1), 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2011.12.004>

40. Frangaj, A., & Fan, Q. R. (2018). Structural biology of GABAB receptor. *Neuropharmacology*, 136(Pt A), 68–79. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.10.011>
41. Foster, D. J., Wilson, J. M., Remke, D. H., Mahmood, M. S., Uddin, M. J., Wess, J., Patel, S., Marnett, L. J., Niswender, C. M., Jones, C. K., Xiang, Z., Lindsley, C. W., Rook, J. M., & Conn, P. J. (2016). Antipsychotic-like Effects of M4 Positive Allosteric Modulators Are Mediated by CB2 Receptor-Dependent Inhibition of Dopamine Release. *Neuron*, 91(6), 1244–1252. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.08.017>
42. Gaoni, Y., & Mechoulam, R. (1964). Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society*, 86(8), 1646–1647. <https://doi.org/10.1021/ja01062a046>
43. Garduño-Gutiérrez, R., León-Olea, M., & Rodríguez-Manzo, G. (2013). The mesolimbic system participates in the naltrexone-induced reversal of sexual exhaustion: opposite effects of intra-VTA naltrexone administration on copulation of sexually experienced and sexually exhausted male rats. *Behavioural brain research*, 256, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.07.056>
44. Glaser, S. T., Abumrad, N. A., Fatade, F., Kaczocha, M., Studholme, K. M., & Deutsch, D. G. (2003). Evidence against the presence of an anandamide transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 4269–4274. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730816100>
45. Golovko, T., Min, R., Lozovaya, N., Falconer, C., Yatsenko, N., Tsintsadze, T., Tsintsadze, V., Ledent, C., Harvey, R. J., Belelli, D., Lambert, J. J., Rozov, A., & Burnashev, N. (2015). Control of Inhibition by the Direct Action of Cannabinoids on GABA(A) Receptors. *Cerebral Cortex*, 25(9), 2440–2455. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhu045>
46. Grace, A. A. (1991). Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: A hypothesis for the etiology

- of schizophrenia. *Neuroscience*, 41(1), 1–24.  
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90196-U](https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90196-U)
47. Grace, Anthony A., Floresco, S. B., Goto, Y., & Lodge, D. J. (2007). Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends in Neurosciences*, 30(5), 220–227.  
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.003>
48. Guadarrama-Bazante, I. L., & Rodríguez-Manzo, G. (2019). Nucleus accumbens dopamine increases sexual motivation in sexually satiated male rats. *Psychopharmacology*, 236(4), 1303–1312.  
<https://doi.org/10.1007/s00213-018-5142-y>
49. Hampe, C. S., Mitoma, H., & Manto, M. (2018). GABA and Glutamate: Their Transmitter Role in the CNS and Pancreatic Islets. In *GABA And Glutamate - New Developments In Neurotransmission Research*. InTech.  
<https://doi.org/10.5772/intechopen.70958>
50. Heaney, C. F., & Kinney, J. W. (2016). Role of GABA(B) receptors in learning and memory and neurological disorders. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 63, 1–28.  
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.01.007>
51. Hernandez D.O. (2017). Participación del Glutamato y la Dopamina en la Reversión de la Saciedad Sexual Inducida por los Endocannabinoides 2-AG y Anandamida. [Tesis de maestría] Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
52. Hull, E. M. & Rodríguez-Manzo, G. (2017). Male Sexual Behavior. In *Hormones, Brain and Behavior: Third Edition* (Vol. 1, pp. 1–57). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803592-4.00001-8>
53. Ibsen, M. S., Connor, M., & Glass, M. (2017). Cannabinoid CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> Receptor Signaling and Bias. *Cannabis and cannabinoid research*, 2(1), 48–60. <https://doi.org/10.1089/can.2016.0037>
54. Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimoto-dani, Y., Uchigashima, M., & Watanabe, M. (2009). Endocannabinoid-mediated control of synaptic

- transmission. *Physiological reviews*, 89(1), 309–380.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2008>
55. Kasten, C. R., & Boehm, S. L. (2015, October 1). Identifying the role of pre-and postsynaptic GABAB receptors in behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 57, 70–87.  
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.08.007>
56. Katona, I., & Freund, T. F. (2012). Multiple Functions of Endocannabinoid Signaling in the Brain. *Annual Review of Neuroscience*, 35(1), 529–558.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062111-150420>
57. Laviolette, S. R., & van der Kooy, D. (2001). GABA(A) receptors in the ventral tegmental area control bidirectional reward signalling between dopaminergic and non-dopaminergic neural motivational systems. *The European journal of neuroscience*, 13(5), 1009–1015.  
<https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2001.01458.x>
58. Liu, Q. R., Canseco-Alba, A., Zhang, H. Y., Tagliaferro, P., Chung, M., Dennis, E., Sanabria, B., Schanz, N., Escosteguy-Neto, J. C., Ishiguro, H., Lin, Z., Sgro, S., Leonard, C. M., Santos-Junior, J. G., Gardner, E. L., Egan, J. M., Lee, J. W., Xi, Z. X., & Onaivi, E. S. (2017). Cannabinoid type 2 receptors in dopamine neurons inhibits psychomotor behaviors, alters anxiety, depression, and alcohol preference. *Scientific reports*, 7(1), 17410. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17796-y>
59. Lu, H. C., & Mackie, K. (2016). An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. *Biological psychiatry*, 79(7), 516–525.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.07.028>
60. Mahler, S. V., Smith, K. S., & Berridge, K. C. (2007). Endocannabinoid hedonic hotspot for sensory pleasure: anandamide in nucleus accumbens shell enhances 'liking' of a sweet reward. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 32(11), 2267–2278.  
<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301376>

61. Manz, K. M., Baxley, A. G., Zurawski, Z., Hamm, H. E., & Grueter, B. A. (2019). Heterosynaptic GABA<sub>B</sub> Receptor Function within Feedforward Microcircuits Gates Glutamatergic Transmission in the Nucleus Accumbens Core. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *39*(47), 9277–9293. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1395-19.2019>
62. Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., & Bonner, T. I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned eDNA, *346*(8), 561–564.
63. Mátyás, F., Urbán, G. M., Watanabe, M., Mackie, K., Zimmer, A., Freund, T. F., & Katona, I. (2008). Identification of the sites of 2-arachidonoylglycerol synthesis and action imply retrograde endocannabinoid signaling at both GABAergic and glutamatergic synapses in the ventral tegmental area. *Neuropharmacology*, *54*(1), 95–107. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.05.028>
64. Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R., ... Vogel, Z. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*, *50*(1), 83–90. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00109-D](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00109-D)
65. Melis, M. R., & Argiolas, A. (1995). Dopamine and sexual behavior. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, *19*(1), 19–38. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(94\)00020-2](https://doi.org/10.1016/0149-7634(94)00020-2)
66. Mazei-Robison, M. S., & Nestler, E. J. (2012). Opiate-induced molecular and cellular plasticity of ventral tegmental area and locus coeruleus catecholamine neurons. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *2*(7), a012070. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012070>
67. Munro, S., Thomas, K. L., & Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, *365*(6441), 61–65. <https://doi.org/10.1038/365061a0>

68. Nicola, S. M., Taha, S. A., Kim, S. W., & Fields, H. L. (2005). Nucleus accumbens dopamine release is necessary and sufficient to promote the behavioral response to reward-predictive cues. *Neuroscience*, *135*(4), 1025–1033. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.06.088>
69. O'Brien C. P. (2009). Neuroplasticity in addictive disorders. *Dialogues in clinical neuroscience*, *11*(3), 350–353. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2009.11.3/cpobrien>
70. Okada, H., Matsushita, N., Kobayashi, K., & Kobayashi, K. (2004). Identification of GABAA receptor subunit variants in midbrain dopaminergic neurons. *Journal of neurochemistry*, *89*(1), 7–14. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02271.x>
71. Olsen, R. W., & Sieghart, W. (2008). International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacological reviews*, *60*(3), 243–260. <https://doi.org/10.1124/pr.108.00505>
72. Paglietti, E., Quarantotti, B. P., Mereu, G., & Gessa, G. L. (1978). Apomorphine and L-DOPA lower ejaculation threshold in the male rat. *Physiology & behavior*, *20*(5), 559–562. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(78\)90247-0](https://doi.org/10.1016/0031-9384(78)90247-0)
73. Paredes, R., & Agmo, A. (1989). Stereospecific actions of baclofen on sociosexual behavior, locomotor activity and motor execution. *Psychopharmacology*, *97*(3), 358–364. <https://doi.org/10.1007/BF00439451>
74. Pérez-Garci, E., Gassmann, M., Bettler, B., & Larkum, M. E. (2006). The GABAB1b isoform mediates long-lasting inhibition of dendritic Ca<sup>2+</sup> spikes in layer 5 somatosensory pyramidal neurons. *Neuron*, *50*(4), 603–616. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.04.019>
75. Pertwee R. G. (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacology & therapeutics*, *74*(2), 129–180. [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(97\)82001-3](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(97)82001-3)

76. Pfaus, J. G., & Phillips, A. G. (1989). Differential effects of dopamine receptor antagonists on the sexual behavior of male rats. *Psychopharmacology*, *98*(3), 363–368. <https://doi.org/10.1007/BF00451688>
77. Pfaus, J. G., Damsma, G., Nomikos, G. G., Wenkstern, D. G., Blaha, C. D., Phillips, A. G., & Fibiger, H. C. (1990). Sexual behavior enhances central dopamine transmission in the male rat. *Brain research*, *530*(2), 345–348. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91309-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91309-5)
78. Pfaus, J. G., & Phillips, A. G. (1991). Role of dopamine in anticipatory and consummatory aspects of sexual behavior in the male rat. *Behavioral neuroscience*, *105*(5), 727–743. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.105.5.727>
79. Qureshi, G. A., & Södersten, P. (1986). Sexual activity alters the concentration of amino acids in the cerebrospinal fluid of male rats. *Neuroscience letters*, *70*(3), 374–378. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(86\)90582-3](https://doi.org/10.1016/0304-3940(86)90582-3)
80. Ramer, R., Schwarz, R., & Hinz, B. (2019). Modulation of the Endocannabinoid System as a Potential Anticancer Strategy. *Frontiers in pharmacology*, *10*, 430. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00430>
81. Riegel, A. C., & Lupica, C. R. (2004). Independent presynaptic and postsynaptic mechanisms regulate endocannabinoid signaling at multiple synapses in the ventral tegmental area. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *24*(49), 11070–11078. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3695-04.2004>
82. Rodrigues-Alves, Patricia & Lebrun, Ivo & Flório, Jorge & Bernardi, Maria & Spinosa, Helenice. (2008). Moxidectin interference on sexual behavior, penile erection, and hypothalamic GABA levels of male rats. *Research in veterinary science*. *84*. 100-6. [10.1016/j.rvsc.2007.04.003](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.04.003).
83. Rodríguez-Manzo, G., & Fernández-Guasti, A. (1994). Reversal of sexual exhaustion by serotonergic and noradrenergic agents. *Behavioural brain research*, *62*(2), 127–134. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(94\)90019-1](https://doi.org/10.1016/0166-4328(94)90019-1)

84. Rodríguez-Manzo G. (1999). Yohimbine interacts with the dopaminergic system to reverse sexual satiation: further evidence for a role of sexual motivation in sexual exhaustion. *European journal of pharmacology*, 372(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(99\)00140-5](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(99)00140-5)
85. Rodríguez-Manzo, G., Pellicer, F., Larsson, K., & Fernández-Guasti, A. (2000). Stimulation of the medial preoptic area facilitates sexual behavior but does not reverse sexual satiation. *Behavioral neuroscience*, 114(3), 553–560.
86. Rodríguez-Manzo G. (2015). Glutamatergic transmission is involved in the long-lasting sexual inhibition of sexually exhausted male rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 131, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.02.002>
87. Rodríguez-Manzo, G., & Canseco-Alba, A. (2015). Biphasic effects of anandamide on behavioural responses: emphasis on copulatory behaviour. *Behavioural pharmacology*, 26(6), 607–615. <https://doi.org/10.1097/FBP.000000000000154>
88. Rodríguez-Manzo, G., & Canseco-Alba, A. (2017). A new role for GABAergic transmission in the control of male rat sexual behavior expression. *Behavioural Brain Research*, 320, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.11.041>
89. Rodríguez-Manzo, G., Guadarrama-Bazante, I. L., & Morales-Calderón, A. (2011). Recovery from sexual exhaustion-induced copulatory inhibition and drug hypersensitivity follow a same time course: Two expressions of a same process? *Behavioural Brain Research*, 217(2), 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.09.014>
90. Rodríguez-Manzo, G., & Pellicer, F. (2007). Electrical stimulation of the ventral tegmental area exerts opposite effects on male rat sexual behaviour expression depending on the stimulated sub region. *Behavioural brain research*, 179(2), 310–313. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.02.006>

91. Rodríguez-Manzo, G., & Pellicer, F. (2010). Electrical stimulation of dorsal and ventral striatum differentially alters the copulatory behavior of male rats. *Behavioral neuroscience*, *124*(5), 686–694. <https://doi.org/10.1037/a0020737>
92. Roth, F. C., & Draguhn, A. (2012). GABA metabolism and transport: effects on synaptic efficacy. *Neural plasticity*, *2012*, 805830. <https://doi.org/10.1155/2012/805830>
93. Russo, S. J., & Nestler, E. J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature reviews. Neuroscience*, *14*(9), 609–625. <https://doi.org/10.1038/nrn3381>
94. Szabo, B., Siemes, S., & Wallmichrath, I. (2002). Inhibition of GABAergic neurotransmission in the ventral tegmental area by cannabinoids. *The European journal of neuroscience*, *15*(12), 2057–2061. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02041.x>
95. Sigel, E., & Steinmann, M. E. (2012). Structure, function, and modulation of GABA(A) receptors. *The Journal of biological chemistry*, *287*(48), 40224–40231. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.386664>
96. Sigel, E., Baur, R., Rácz, I., Marazzi, J., Smart, T. G., Zimmer, A., & Gertsch, J. (2011). The major central endocannabinoid directly acts at GABA(A) receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(44), 18150–18155. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113444108>
97. Schwarzer, C., Berresheim, U., Pirker, S., Wieselthaler, A., Fuchs, K., Sieghart, W., & Sperk, G. (2001). Distribution of the major  $\gamma$ -aminobutyric acid A receptor subunits in the basal ganglia and associated limbic brain areas of the adult rat. *The Journal of Comparative Neurology*, *433*(4), 526–549. <https://doi.org/10.1002/cne.1158>
98. Tagliamonte, A., Fratta, W., Del Fiacco, M., & Gessa, G. L. (1974). Possible stimulatory role of brain dopamine in the copulatory behavior of male rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *2*(2), 257–260. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(74\)90061-6](https://doi.org/10.1016/0091-3057(74)90061-6)

99. Tan, K. R., Yvon, C., Turiault, M., Mirzabekov, J. J., Doehner, J., Labouèbe, G., Deisseroth, K., Tye, K. M., & Lüscher, C. (2012). GABA neurons of the VTA drive conditioned place aversion. *Neuron*, *73*(6), 1173–1183. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.015>
100. Vinkers, Christiaan & Olivier, Berend. (2012). Mechanisms Underlying Tolerance after Long-Term Benzodiazepine Use: A Future for Subtype-Selective GABA(A) Receptor Modulators? *Advances in pharmacological sciences*. 2012. 416864. [10.1155/2012/416864](https://doi.org/10.1155/2012/416864).
101. Waldmeier, P. C., Kaupmann, K., & Urwyler, S. (2008). Roles of GABAB receptor subtypes in presynaptic auto- and heteroreceptor function regulating GABA and glutamate release. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria: 1996)*, *115*(10), 1401–1411. <https://doi.org/10.1007/s00702-008-0095-7>
102. Winters, B. D., Krüger, J. M., Huang, X., Gallaher, Z. R., Ishikawa, M., Czaja, K., Krueger, J. M., Huang, Y. H., Schlüter, O. M., & Dong, Y. (2012). Cannabinoid receptor 1-expressing neurons in the nucleus accumbens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(40), E2717–E2725. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206303109>
103. Wirtshafter, David & Sheppard, Amy. (2001). Localization of GABA(B) receptors in midbrain monoamine containing neurons in the rat. *Brain research bulletin*. *56*. 1-5. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(01\)00487-7](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00487-7).
104. Wise, R. A. (1980). The dopamine synapse and the notion of “pleasure centers” in the brain. *Trends in Neurosciences*. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(80\)90035-1](https://doi.org/10.1016/0166-2236(80)90035-1)
105. Xi, Z. X., & Stein, E. A. (1998). Nucleus accumbens dopamine release modulation by mesolimbic GABA(A) receptors - An in vivo electrochemical study. *Brain Research*, *798*(1–2), 156–165. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)00406-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)00406-5)

106. Xu, Chanjuan & Zhang, Wenhua & Rondard, Philippe & Pin, Jean-Philippe & Liu, Jianfeng. (2014). Complex GABAB receptor complexes: How to generate multiple functionally distinct units from a single receptor. *Frontiers in pharmacology*, 5, 12. 10.3389/fphar.2014.00012.
107. Yamaguchi, T., Sheen, W., & Morales, M. (2007). Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area. *The European journal of neuroscience*, 25(1), 106–118. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05263.x>
108. Zendejdel M, Tirgari F, Shohre B, Deldar H, Hassanpour S (2017). Involvement of GABA and cannabinoid receptors in central food intake regulation in neonatal layer chicks: role of CB1 and GABAA receptors. *British Poultry Science*, 19(2):51-60.
109. Zhang, L., & Xiong, W. (2009). Modulation of the Cys-loop ligand-gated ion channels by fatty acid and cannabinoids. *Vitamins and hormones*, 81, 315–335. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(09\)81012-1](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(09)81012-1)
110. Zhang, H. Y., Gao, M., Liu, Q. R., Bi, G. H., Li, X., Yang, H. J., Gardner, E. L., Wu, J., & Xi, Z. X. (2014). Cannabinoid CB2 receptors modulate midbrain dopamine neuronal activity and dopamine-related behavior in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(46), E5007–E5015. <https://doi.org/10.1073/pnas.1413210111>
111. Zhang, H. Y., Gao, M., Shen, H., Bi, G. H., Yang, H. J., Liu, Q. R., Wu, J., Gardner, E. L., Bonci, A., & Xi, Z. X. (2017). Expression of functional cannabinoid CB<sub>2</sub> receptor in VTA dopamine neurons in rats. *Addiction biology*, 22(3), 752–765. <https://doi.org/10.1111/adb.12367>
112. Zou, S., & Kumar, U. (2018). Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *International journal of molecular sciences*, 19(3), 833. <https://doi.org/10.3390/ijms19030833>