CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SEDE SUR

DEPARTAMENTO DE

FARMACOBIOLOGÍA

Evaluación de la posible interacción conductual entre dos tipos de estimulación del sistema mesolímbico, la actividad sexual y la administración de metanfetamina, en ratas macho

T E S I S

Que presenta

VALERIA VIOLANTE SORIA

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN NEUROFARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA EXPERIMENTAL

Directoras de la Tesis:

Dra. Silvia Lorenia Cruz Martín del Campo

Dra. Gabriela Rodríguez Manzo

Ciudad de México Mayo, 2023

Agradecimientos

Este trabajo se realizó en los laboratorios 10 y 18 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) bajo la dirección de la Dra. Silvia Lorenia Cruz Martín del Campo y de la Dra. Gabriela Rodríguez Manzo. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca de doctorado con número 704472 para estudios de posgrado a nivel nacional. El trabajo fue financiado parcialmente por el proyecto de CONACYT con No. 220772 (GRM).

Las Dras. Silvia Lorenia Cruz Martín del Campo y Gabriela Rodríguez Manzo son un ejemplo de investigadoras de excelencia, agradezco su disposición y esfuerzo al brindarme una mentoría que me beneficiará de por vida. Gracias por todas las herramientas profesionales que me proporcionaron y por su compromiso inquebrantable al dirigir esta tesis.

Asimismo, deseo expresar lo valioso que fueron las aportaciones y dedicación de mis sinodales al evaluar el presente trabajo. Doctores Nayeli Páez Martínez, Claudia González Espinosa, Carolina López Rubalcava, y José Alonso Fernández Guasti, gracias por elevar la calidad de este proyecto a través de sus cuestionamientos y sugerencias. Gracias por su amabilidad y disposición.

Este trabajo no hubiera sido el mismo sin el apoyo de los técnicos y auxiliares de los laboratorio 10 y 18: Araceli Hernández, Abraham Contreras, Ángeles Ceja y René Garduño, gracias por las enseñanzas y consejos.

Compañeros de laboratorios, agradezco el tiempo que dedicaron a cada uno de mis seminario y su disposición para compartir sus conocimientos. Gracias por hacer muy agradable la estancia en cada laboratorio.

Contenido

Resumen 1

Abstract 3

1. Introducción 5

El sistema dopaminérgico 5

Los sistemas dopaminérgicos del mesencéfalo 6

Participación del sistema mesolímbico ante estímulos recompensantes 7

La conducta sexual de la rata macho 9

La saciedad sexual 11

Cambios en el sistema mesolímbico asociados con la saciedad sexual ... 13

Las drogas psicoestimulantes: metanfetamina 14

Efectos conductuales de la metanfetamina 17

Neuroplasticidad inducida por la exposición repetida a metanfetamina 19

Interacción entre la actividad sexual y las anfetaminas 21

Planteamiento del problema 22

2. Hipótesis 23

3. Objetivos 23

4. Materiales y métodos 25

4.1 Animales 25

4.2 Fármacos 26

4.3 Actividad sexual 26

4.4 Prueba de actividad motora 28

4.5 Prueba de sensibilización locomotora 29

4.6 Prueba de preferencia de lugar condicionada 30

4.7 Procesamiento de las muestras de tejido 31

4.8 Western Blot 32

4.9 Análisis estadístico 34

4.10 Diseño experimental 35

5. Resultados 39

La metanfetamina retrasa el establecimiento de la saciedad sexual 39

La actividad sexual aumenta la locomoción inducida por metanfetamina . 43

La actividad sexual favorece el desarrollo y la expresión de la sensibilización locomotora 47

La saciedad sexual potencia el efecto recompensante de la metanfetamina 50

Evaluación de la expresión de los D1R, D2R y del DAT en regiones estriatales de animales tratados con metanfetamina o que tuvieron actividad sexual 51

La metanfetamina y la actividad sexual modifican diferencialmente la expresión de los receptores y transportador de DA en diferentes áreas estriatales 55

La metanfetamina produce cambios en la expresión de los receptores y del transportador de dopamina en diferentes regiones del estriado dependiendo de la condición sexual 56

6. Discusión 59

6.1 El efecto de la metanfetamina sobre el desarrollo de la saciedad sexual 60

6.2 El impacto de la condición sexual sobre los efectos conductuales de la metanfetamina 63

6.3 Expresión de los receptores a DA y del DAT en el estriado después de la metanfetamina o de la actividad sexual 69

7. Resumen de resultados 74

8. Conclusiones 77

9. Perspectivas 79

Referencias 81

Anexos 94

Lista de tablas

Tabla 1. Proporción y porcentaje de animales sexualmente saciados, pretratados con metanfetamina o el vehículo 43

Tabla 2. Parámetros de los ANOVAs de dos vías parámetros correspondientes a la figura 16 53

Tabla 3. Parámetros de los ANOVAs de dos vías parámetros correspondientes a la figura 17 55

Tabla 4. Cambios en la densidad de D1R, D2R y DAT en diferentes regiones del estriado por la administración de metanfetamina o por la actividad sexual 56

Tabla 5. Cambios en la densidad de D1R, D2R y DAT en diferentes regiones del estriado por la administración metanfetamina en animales con diferente condición sexual 57

Lista de figuras

Figura 1. Regiones del estriado en el cerebro de rata. 7

Figura 2. Sistemas dopaminérgicos del mesencéfalo en el cerebro de rata… 9

Figura 4. Mecanismo de acción de la metanfetamina. 16

Figura 5. Diseño experimental del experimento 1. 35

Figura 6 Diseño experimental del experimento 2. 36

Figura 7. Diseño experimental del experimento 3. 37

Figura 8. Diseño experimental del experimento 4. 38

Figura 9. Efecto de la administración aguda de diferentes dosis de metanfetamina sobre los parámetros específicos durante el desarrollo de la saciedad sexual. 42

Figura 10. Cambios en curso de la saciedad sexual. 42

Figura 11. Efectos locomotores inducidos por metanfetamina en animales con diferente condición sexual. 44

Figura 12. Movimientos locomotores y estereotipados inducidos por la metanfetamina en animales con diferente condición sexual..... 46

Figura 13. Desarrollo de la sensibilización locomotora inducida por la metanfetamina en animales con diferente condición sexual..... 48

Figura 14. Expresión de la sensibilización locomotora inducida por metanfetamina en animales con diferente condición sexual..... 49

Figura 15. Efectos recompensantes inducidos por metanfetamina en animales con diferente condición sexual. 50

Figura 16. Efecto de la administración aguda de metanfetamina y de la condición sexual sobre la expresión de los receptores y del transportador a dopamina en diferentes regiones del estriado de ratas macho. 52

Figura 17. Efecto de la administración repetida de metanfetamina y de la condición sexual sobre la expresión de los receptores y del transportador a dopamina en diferentes regiones del estriado de ratas macho. 54

Figura 18. Relación de cambios moleculares producidos por la condición sexual y el esquema de tratamiento con metanfetamina..... 75

Lista de abreviaturas

ANOVA, análisis de varianza

ATV, área tegmental ventral

C, control

CPu, caudado putamen

D1R, receptor a dopamina tipo D1

D2R, receptor a dopamina tipo D2

DA, dopamina

DAT, transportador de dopamina

Met, metanfetamina

NAc, núcleo accumbens

NC, no condicionado

NS, no sensibilizado

NEM, neuronas espinosas medianas

PLC, preferencia de lugar condicionada

S-S, sexualmente saciado

VMAT2, transportador vesicular de monoamina

Resumen

La cópula es una conducta recompensante para las ratas macho, ellas son capaces de copular de manera repetida en un periodo breve (7 eyaculaciones en promedio en aprox. 2.5 h) hasta quedar sexualmente saciadas. En un lapso de 24 a 72 h post-saciedad, las ratas exhiben poco o nulo interés por copular nuevamente (inhibición sexual). Durante la cópula repetida hay un incremento sostenido en la liberación de dopamina (DA) en el núcleo accumbens (NAc). En contraste, a las 24 h post-saciedad los niveles basales de DA son menores que en el día anterior. Bloquear la transmisión dopaminérgica durante la cópula repetida no impide que la saciedad sexual se establezca. Sin embargo, estimular la transmisión dopaminérgica, directa o indirectamente, a las 24 h post-saciedad revierte la inhibición sexual. La metanfetamina (Met) aumenta la liberación de DA en el NAc en una magnitud superior a la que se produce por recompensas naturales. La estimulación dopaminérgica inducida por Met se relaciona estrechamente con sus efectos motores y recompensantes. En este trabajo estudiamos a nivel conductual la interacción entre la Met y la saciedad sexual, ya fuera durante la cópula repetida asociada a la saciedad sexual o a las 24 h. También analizamos la inducción de cambios moleculares producidos por cada uno de estos estímulos. Encontramos que la Met prolongó el desarrollo de la saciedad sexual, pero no modificó el porcentaje de ratas macho que estaban sexualmente saciadas e inhibidas. Los efectos recompensantes de la Met se potenciaron en animales sexualmente saciados. Los efectos locomotores se exacerbaron si los animales copulaban un día antes, independientemente de la intensidad de la cópula. Tanto la estimulación sexual, como la Met (aguda o repetida), por sí solas cambiaron la densidad de los receptores a dopamina tipo D1 y D2 (D1R, D2R) o la expresión del transportador a DA (DAT) en el estriado, pero de manera diferencial, la Met redujo la expresión del D2R y aumento la densidad del DAT en el NAc *shell*, mientras que la actividad sexual modificó la cantidad de las mismas proteínas pero en el NAc *core* y el CPu: en el primero la expresión del DAT se redujo y en el segundo la del D2R; la cópula hasta la saciedad fue el único estímulo que aumentó la expresión del D1R y lo hizo en el NAc *core*. Cuando la Met se administró a las ratas macho estimuladas sexualmente, sus efectos en el NAc *shell* fueron opuestos a los que describieron por la Met sola, y si las ratas tenían la condición de estar sexualmente saciadas, la Met redujo la expresión de receptores dopaminérgicos en el NAc *core* y el CPu. En conclusión, un estímulo natural de tipo sexual puede modificar los efectos de la Met a nivel conductual y a nivel molecular, lo que evidencia una sensibilización cruzada entre dos estímulos recompensantes de diferente naturaleza.

Abstract

Copulation is a rewarding behavior for male rats, they could display it repeatedly in a short period (typically 7 ejaculations in approximately 2.5 h) until they become sexually satiated. Between 24 to 72 h post-satiety, rats show little or no interest in copulating (sexual inhibition). During repeated copulation associated with sexual satiety, males show elevated dopamine (DA) release in the nucleus accumbens (NAc). In contrast, 24 h post-satiety, DA basal levels are lower than the day before. Blocking dopaminergic transmission during repeated copulation does not prevent sexual satiety establishment. However, stimulates DA transmission (directly or indirectly) 24 hours after satiety reversed sexual inhibition. Methamphetamine (Met) increases DA release in the NAc to a greater extent than natural rewards. Met-induced dopaminergic stimulation is related to its rewarding and motor effects. In this work, we studied the interaction between Met and sexual satiety at a behavioral level, either during repeated copulation associated with sexual satiety or 24 h later. We also analyze the induction of molecular changes produced by each of these stimuli. We found that Met prolonged sexual satiety but did not modify the percentage of male rats sexually satiated or sexually inhibited. Met's rewarding effect was potentiated in sexually satiated animals. Met's locomotor effects were exacerbated if animals copulated the day before, regardless of the intensity. Both sexual stimulation and Met (acute or repeated) changed the density of D1 and D2 dopamine receptors (D1R, D2R) or the expression of the DA transporter (DAT) in the striatum, but in a differential manner. Met reduced D2R expression and increased DAT density in the NAc shell, whereas sexual activity modified these proteins in the NAc core and the CPu: DAT expression was reduced in the former and D2R density in the latter. Copulation to satiety was the only stimulus that affected D1R, increasing its expression in the NAc core. When Met was administered to sexually stimulated males its effects in the NAc shell were opposite to those described by Met alone, and if rats were sexually satiated, Met reduced the expression of dopaminergic receptors in the NAc core and CPu. In conclusion, a natural stimulus such as sexual behavior can modify the effects of a psychostimulant drug at the behavioral and molecular levels, evidencing cross-sensitization between two rewarding stimuli of different natures.

1. Introducción

¿Cómo se procesan los estímulos placenteros o hedónicos?, ¿qué regiones del cerebro están involucradas?, ¿cómo se sensibilizan y desensibilizan los sistemas que procesan esos estímulos?, ¿cómo se desregulan dichos sistemas cerebrales en trastornos como la adicción? Estas son algunas de las preguntas fundamentales en las Neurociencias contemporáneas.

Los estímulos placenteros poseen dos componentes, el *liking*, o gusto, que se refiere al impacto hedónico que produce un estímulo; y el *wanting,* o deseo*,* que incluye las características que vuelven atractivos a estos estímulos y que conducen o motivan a los sujetos a su búsqueda (Robinson & Berridge, 1993; Olney *et al.*, 2018; Badiani *et al.*, 2019). Existen evidencias de que la transmisión dopaminérgica está asociada con ambos componentes. En particular, sujetos que poseen un tono hipodopaminérgico perciben más atractivos los estímulos placenteros, mayor *liking*; mientras que un tono hiperdopaminérgico promueve las conductas dirigidas a obtener estímulos apetitosos, facilitación del *wanting* (Pecina *et al.*, 2004; Blum *et al.*, 2012).

Estudiar las consecuencias que tienen las drogas de abuso en sujetos que expresan un sistema dopaminérgico desregulado puede conducir a la identificación de las primeras neuroadaptaciones en las regiones que regulan estos procesos. Este trabajo analiza la interacción de dos estímulos gratificantes que modifican el sistema dopaminérgico: la conducta sexual en ratas macho y el consumo de metanfetamina. En los siguientes apartados, se revisan brevemente las características principales de cada uno de los estímulos y el sistema sobre el que actúan.

El sistema dopaminérgico

La dopamina (DA) es un neurotransmisor sintetizado en el citoplasma de las terminales axónicas de las neuronas dopaminérgicas por la acción secuencial de la enzima tirosina hidroxilasa y la descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos. La DA sintetizada es transportada al interior de las vesículas

sinápticas por acción del transportador vesicular de monoaminas tipo 2 (VMAT2), para después ser liberada al espacio sináptico por exocitosis. El transportador membranal de DA (DAT) remueve a la DA del espacio sináptico y la re-ingresa a las terminales dopaminérgicas para reciclarla. Las enzimas monoamino-oxidasa A (MAO-A) y catecol-O-metil-transferasa son las responsables de degradar a la DA (Meyer & Quenzer, 2019a). La DA es el ligando endógeno de dos familias de receptores metabotrópicos, acoplados a proteínas G: la familia de receptores tipo D1 (D1-like) que incluye a los subtipos de receptores D1 y D5 (D1R, D5R) y la familia tipo D2 (D2-like) que agrupa a los subtipos de receptores D2, D3 y D4 (D2R, D3R y D4R). Esta clasificación se basa en el mecanismo de transducción de los receptores, ya que los primeros están acoplados a proteínas Gs, mientras que los segundos a proteínas Gi (Meyer & Quenzer, 2019a). En consecuencia, los D1-like y los D2-like aumentan y disminuyen la acumulación de adenosín monofosfato cíclico (AMPc), respectivamente. La mayoría de los receptores dopaminérgicos se concentra en regiones subcorticales, en particular en los núcleos estriatales. De manera interesante, el 95% de las neuronas estriatales son neuronas espinosas medianas (NEM) de naturaleza GABAérgica que se clasifican por el tipo de receptor a DA que expresan, NEM que expresan D1R o que expresan D2R (Yager *et al.*, 2015) (Fig. 1).

Los sistemas dopaminérgicos del mesencéfalo

Las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo se caracterizan por tener sus cuerpos neuronales principalmente en la sustancia negra (*substantia nigra,* SN*)* y el área tegmental ventral (ATV), dos regiones adyacentes entre sí (Fig. 2). Estas neuronas también se caracterizan por tener axones largos que recorren el encéfalo de manera caudo-rostral, hasta alcanzar regiones límbicas y corticales, en particular la corteza prefrontal y los núcleos del estriado donde se libera principalmente el neurotransmisor y donde se concentra la mayoría de los receptores dopaminérgicos. El estriado se puede dividir en dos núcleos, el núcleo caudado-putamen (CPu) ubicado en la parte

dorsal y el núcleo accumbens (NAc) en la porción ventral. El NAc a su vez se subdivide en dos regiones: la corteza y el centro, sin embargo es más común referirse a ellos por sus términos en inglés *shell* y *core*. Las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo se organizan en tres vías principales: nigroestriatal, mesolímbica y mesocortical. El sistema nigroestriatal se refiere a las neuronas dopaminérgicas cuyos somas se originan en la SN y sus axones llegan al núcleo CPu, mientras que el sistema mesolímbico tiene sus somas en el ATV y sus proyecciones alcanzan las regiones *core* y *shell* del NAc. Finalmente el sistema mesocortical también se origina en el ATV pero sus axones proyectan a la corteza prefrontal medial (Meyer & Quenzer, 2019a). En este trabajo, nos vamos a enfocar en los primeros dos sistemas.

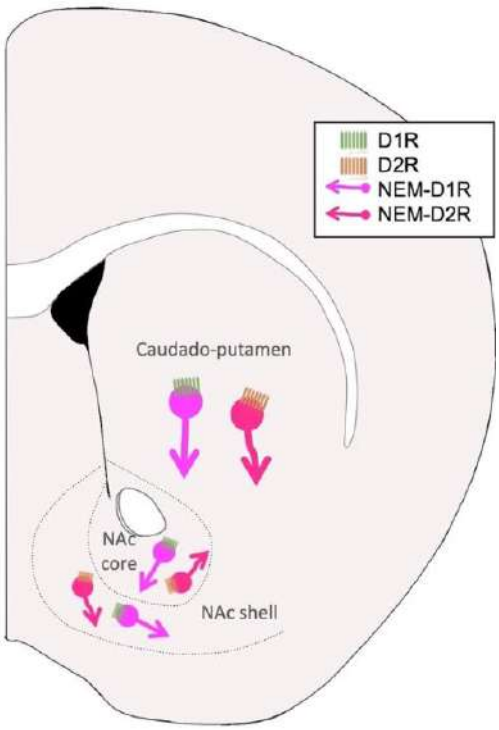

Figura 1. Regiones del estriado en el cerebro de rata. Se representan las subregiones del estriado y los receptores dopaminérgicos que se encuentran en las neuronas espinosas medianas (NEM) en un corte coronal del hemisferio izquierdo.

Participación del sistema mesolímbico ante estímulos recompensantes

Los estímulos gratificantes, o recompensantes, son aquellos que producen estados hedónicos y que aumentan la frecuencia o el vigor con el que se

realizan ciertas conductas dirigidas a obtener esos estímulos (Russo & Nestler, 2013; Badiani *et al.*, 2019). Los estímulos recompensantes se pueden clasificar en dos grupos: aquellos obtenidos de fuentes naturales como la comida apetitosa, los estímulos sexuales y las interacciones sociales, y aquellos que poseen acciones farmacológicas como las drogas de abuso (Kelley & Berridge, 2002; Wise, 2009; Nall *et al.*, 2021). Pese a que estos estímulos son de diferente naturaleza, pueden activar a los sistemas nigroestriatal, mesocortical y mesolímbico, siendo este último el mejor caracterizado.

En el sistema mesolímbico se ha postulado que la liberación de DA depende de dos tipos de patrones de disparo neuronal. Así, disparos irregulares llamados tipo marcapaso producen la liberación tónica de DA, y disparos en ráfaga producen su liberación fásica (Ikemoto & Panksepp, 1999; Ikemoto, 2007; Bardo, 2013). La liberación fásica de DA está relacionada extensamente con el procesamiento de estímulos recompensantes (Berridge & Robinson, 1998; Grace *et al.*, 2007). Sin embargo, hay nuevas evidencias que indican que la liberación tónica de DA se asocia a conductas motivadas (Kremer *et al.*, 2020; de Jong *et al.*, 2022), que el disparo de las neuronas dopaminérgicas del mesolímbico tiene más de dos patrones de disparo y por lo tanto más de dos formas de liberar la DA (Mohebi *et al.*, 2019), e incluso la liberación de DA puede ser independiente del disparo neuronal procedente del soma de las neuronas dopaminérgicas (Threlfell *et al.*, 2012; Berke, 2018).

Las aferencias que recibe el sistema mesolímbico modulan directa e indirectamente la liberación de DA. Entre los principales sistemas de neurotransmisión están el glutamatérgico, GABAérgico, colinérgico y algunos péptidos como los opioides y las orexinas (Russo & Nestler, 2013; Nieh *et al.*, 2016) (Fig. 2).

Todos los estímulos recompensantes que se experimentan por primera vez aumentan la liberación de DA en el sistema mesolímbico, esta liberación depende del tipo de estímulo, de su duración y de los antecedentes de los sujetos. Por ejemplo, en roedores la estimulación sexual y la comida apetitosa aumentan la liberación de DA en el NAc entre 150 y 250% (Pfaus *et al.*, 1990; Damsma *et al.*, 1992; Fiorino *et al.*, 1997; Bassareo & Di Chiara, 1999), mientras que las drogas de abuso que producen la mayor liberación de DA, las anfetaminas, pueden producir un incremento de más del 1000% (Butcher *et al.*, 1988; Di Chiara & Imperato, 1988a; Kuczenski *et al.*, 1991; Egenrieder *et al.*, 2020).

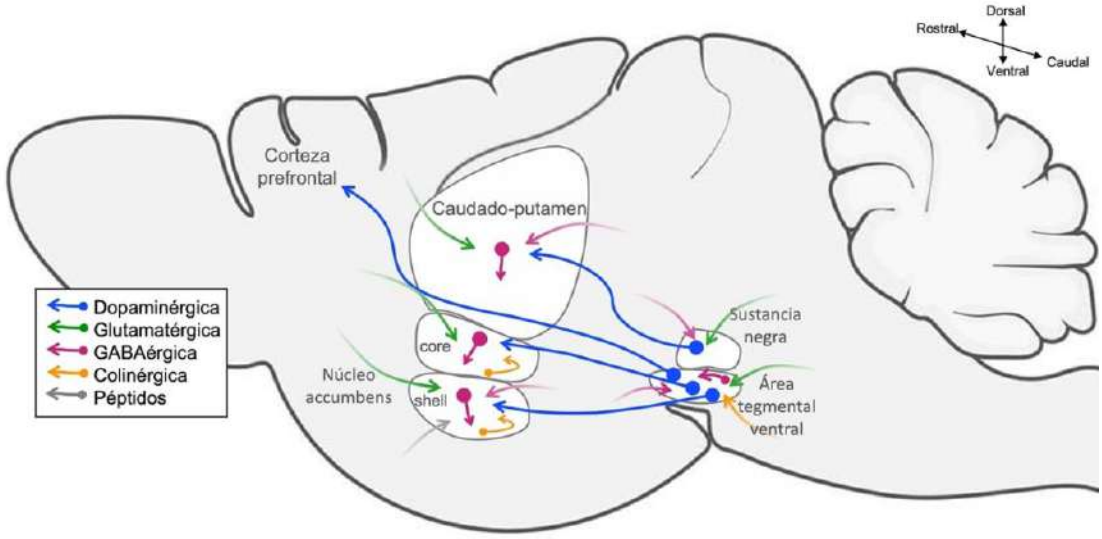

Figura 2. Sistemas dopaminérgicos del mesencéfalo en el cerebro de rata. Representación de las áreas y vías que conforman a los sistemas mesolímbico, mesocortical y nigroestriatal, así como los sistemas de neurotransmisión que modulan su actividad. Vista sagital del cerebro.

La conducta sexual de la rata macho

La conducta sexual en los roedores es una conducta innata y genéticamente determinada, y es susceptible de mejorar con la experiencia (Rodríguez-Manzo & Canseco-Alba, 2014). En las ratas macho, esta conducta sigue un patrón estereotipado que consiste en la expresión de una serie de montas e

intromisiones intercaladas y sucesivas hasta que se presenta la eyaculación. La eyaculación, en particular, es la respuesta que genera el mayor efecto recompensante de la cópula (Tenk *et al.*, 2009). Después de la eyaculación, las ratas macho presentan un periodo breve de inhibición sexual en el que dejan de responder a la estimulación de la hembra, denominado intervalo post-eyaculatorio. Una vez que este periodo transcurre, las ratas macho recuperan la capacidad de copular (Karen & Barfield, 1975).

Las ratas macho que adquieren experiencia sexual (a través de varias sesiones de cópula) reducen la cantidad de montas e intromisiones y el tiempo que tardan (latencia) en presentarlas (Pfeiffer & Johnston, 1994; Woodson, 2002). Un porcentaje alto de estos animales logra estabilizar el patrón copulatorio y expresarlo de manera óptima, por lo que se denominan machos sexualmente expertos. Una serie copulatoria típica de las ratas macho sexualmente expertas sigue los siguientes parámetros: latencia de intromisión menor a un minuto, pocas montas e intromisiones (menos de 10 o 15, respectivamente), una latencia de eyaculación menor a 15 min y un intervalo post-eyaculatorio de aproximadamente 5 min (Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1995; González-Morales & Rodríguez-Manzo, 2020).

En ratas macho sexualmente experimentadas, la concentración de DA en el NAc aumenta cuando perciben a una hembra sexualmente receptiva aun sin tener acceso a ella, y los niveles de DA se elevan aún más cuando interactúan sexualmente con ella (Pfaus *et al.*, 1990; Damsma *et al.*, 1992; Wenkstern *et al.*, 1993; Fiorino *et al.*, 1997). Además, mediante diferentes técnicas (lesiones intracerebrales, experimentos farmacológicos, marcadores de actividad neuronal, registros electrofisiológicos e imagenología) se ha confirmado que la actividad sexual modula al sistema mesolímbico (Balfour *et al.*, 2004, 2006; Matsumoto *et al.*, 2012; Aguilar-Moreno *et al.*, 2022); y a la inversa, éste sistema regula la expresión de la cópula (Eibergen & Caggiula, 1973; Rodríguez-Manzo & Pellicer, 2007, 2010). Adicionalmente, la estimulación sexual repetida modifica el sistema mesolímbico. Por ejemplo, conforme los

roedores hembra o macho incrementan su experiencia sexual aumenta la respuesta neuronal de las neuronas del NAc y del ATV (West *et al.*, 1992; López & Ettenberg, 2002; Pitchers *et al.*, 2012) y cambia la expresión y distribución de receptores opioidérgicos en el ATV (Garduño-Gutiérrez *et al.*, 2013a, 2018), o de receptores glutamatérgicos en el NAc (West *et al.*, 1992; López & Ettenberg, 2002; Pitchers *et al.*, 2012). Por lo tanto, el sistema mesolímbico se activa por la conducta sexual y es susceptible de modificarse por la experiencia sexual.

La saciedad sexual

Una forma de estimular al sistema mesolímbico ocurre al permitir que las ratas macho sexualmente expertas copulen sin restricción con una misma hembra receptiva. Durante esa interacción sexual, las ratas macho expresan varias series copulatorias, presentando entre 5 - 12 eyaculaciones sucesivas, hasta que cesan de copular y quedan sexualmente saciados (Fig. 3) (Beach & Jordan, 1956; Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1994; Hull & Rodríguez-Manzo, 2017). A las de 24 h de haber copulado intensamente, los animales presentan una inhibición de la conducta sexual que se expresa de dos maneras: por la ausencia de conducta sexual en presencia de una nueva hembra receptiva en aproximadamente 2/3 de la población; o bien, por la ejecución de una serie eyaculatoria después de la cual los animales no reinician la cópula en 1/3 de la población (Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1994). El estado de inhibición sexual es de larga duración ya que permanece bien instalado por aproximadamente 72 h, y no es sino hasta después de 15 días de inactividad sexual que los animales recuperan su capacidad eyaculatoria inicial (Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1994; Rodríguez-Manzo *et al.*, 2011). Este efecto contrasta con lo que se observa en animales a los que se les permite copular hasta alcanzar una eyaculación, ya que a las 24 h el 100% de la población es capaz de copular con características

similares a aquellas que presentó en su primera prueba (Rodríguez-Manzo *et al.*, 2011).

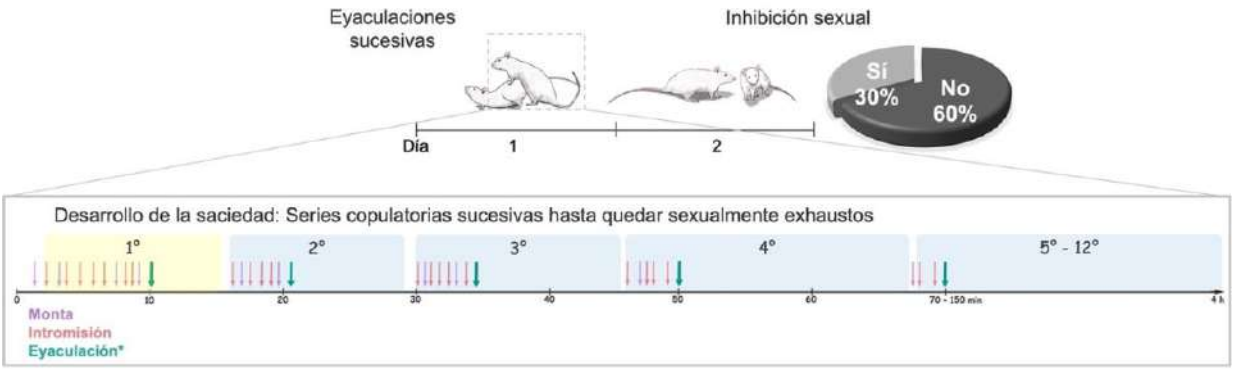

Figura 3. Fenómeno de saciedad sexual. Representación de las series copulatorias que se expresan durante el desarrollo de la saciedad sexual (día 1) y la inhibición sexual de las ratas saciadas a las 24 h (día 2).

Además de la inhibición sexual, las ratas macho sexualmente saciadas expresan una hipersensibilidad a fármacos monoaminérgicos. Por ejemplo, un antagonista dopaminérgico no selectivo, haloperidol, produce efectos motores en animales sexualmente saciados con dosis que carecen de efecto en ratas sexualmente expertas (Rodríguez-Manzo, 1999). De manera similar, el agonista de los receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, produce síntomas del síndrome serotoninérgico en las ratas sexualmente saciadas a dosis que son sub-efectivas para animales sexualmente expertos y *naïve* (Rodríguez-Manzo *et al.*, 2011). Esta hipersensibilidad al 8-OH-DPAT se expresa por 72 h, que es la misma ventana temporal en la que se presenta la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas y el ATV participa en la expresión de este fenómeno (Rodríguez-Manzo *et al.*, 2011; González-Morales & Rodríguez-Manzo, 2020). La inhibición sexual y la hipersensibilidad a fármacos que caracteriza a las ratas sexualmente saciadas pueden ser un reflejo de cambios en el funcionamiento del sistema mesolímbico promovidos por la estimulación sexual intensa.

Cambios en el sistema mesolímbico asociados con la saciedad sexual

Hay evidencias de que el sistema mesolímbico, en particular el ATV y el NAc, se modifica durante y después de la cópula hasta la saciedad. Por ejemplo, en el ATV la densidad de los receptores a opioides μ aumenta después de que las ratas macho eyaculan una vez, pero si los animales copulan hasta la saciedad sexual, los receptores μ se internalizan (Garduño-Gutiérrez *et al.*, 2013a). De manera similar, una eyaculación o la saciedad sexual disminuyen la densidad de los receptores endocannabinoides del tipo CB1 en el ATV, y estos receptores se encuentran internalizados en neuronas del ATV, sólo si las ratas copulan hasta la saciedad (Rodríguez-Manzo *et al.*, 2021). Por otro lado, la densidad o composición de los receptores glutamatérgicos tipo AMPA y NMDA del ATV se altera después de la cópula hasta la saciedad sexual, y en ocasiones después de una eyaculación (Rodríguez-Manzo *et al.*, 2021). Esta serie de cambios en los receptores opioidérgicos, cannabinoides y glutamatérgicos indican que fueron activados por sus ligandos endógenos y que su internalización y los cambios en su composición pudieran ser mecanismos para contrarrestar la sobreestimulación neuronal. Pareciera que la cópula hasta la saciedad activa varios sistemas de neurotransmisión en el circuito mesolímbico.

Aparte de los sistemas que ya se mencionaron (glutamatérgico, opioidérgico y endocannabinoide) los sistemas colinérgico, GABAérgico, noradrenérgico, serotonérgico y dopaminérgico también participan en el establecimiento y/o el mantenimiento de la inhibición sexual que caracteriza a la saciedad sexual (Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1994; Garduño-Gutiérrez *et al.*, 2013b; Guadarrama-Bazante *et al.*, 2014; Canseco-Alba & Rodríguez-Manzo, 2016; Rodríguez-Manzo & Canseco-Alba, 2017; Guadarrama-Bazante & Rodríguez-Manzo, 2019). Como se mencionó previamente, todos estos sistemas de neurotransmisión son capaces de modular directa o indirectamente la actividad de las neuronas dopaminérgicas en el ATV o la liberación de DA de las terminales dopaminérgicas en el NAc (Fig. 2). Por ello,

se ha propuesto que la DA podría ser la vía final común para la reversión de la saciedad (Rodríguez-Manzo, 1999).

También hay evidencias de que en el NAc ocurren cambios asociados a la saciedad sexual. Por ejemplo, durante una sesión de cópula hasta la saciedad, las concentraciones de DA en el NAc incrementan hasta 250% y se mantienen elevadas durante el tiempo en el que los animales eyaculan repetidamente (aprox. 60 min). Cuando estos cesan de copular, la DA regresa a sus niveles basales (Fiorino *et al.*, 1997; Canseco-Alba *et al.*, 2022). En cambio, en las ratas que eyaculan una vez, el pico de DA es de magnitud similar al de los machos que copulan repetidamente no obstante tiene una duración menor. Las diferencias entre estos grupos son más evidentes a las 24 h, las ratas macho sexualmente saciadas presentan una reducción de la concentración de DA basal en el NAc en comparación con la que presentaban ellos mismos antes de la sesión de cópula hasta la saciedad. En cambio, esta reducción no se presenta en los animales que sólo eyacularon una vez 24 h antes (Canseco-Alba *et al.*, 2022). Así, la liberación de DA inducida de manera natural por una conducta motivada posiblemente prolonga la activación de las neuronas dopaminérgicas del sistema mesolímbico.

Con base en estos antecedentes, es probable que la liberación tónica reducida de DA en el NAc, que se ha observado en las ratas sexualmente saciadas, modifique los efectos de fármacos que tengan como blanco la liberación de DA en esta región del estriado.

Las drogas psicoestimulantes: metanfetamina

Las drogas de abuso activan el sistema mesolímbico, ya sea al aumentar el disparo neuronal en las neuronas dopaminérgicas del ATV o al modular los niveles extracelulares de DA en el NAc. En estas dos regiones se localizan los blancos moleculares específicos para cada tipo de droga. Por ejemplo, los opioides activan el sistema mesolímbico al estimular a sus receptores en el ATV y el NAC; el alcohol ejerce sus acciones en los receptores $GABA_A$ y éstos

aumentan por un lado, la liberación de DA en el NAc y por otro lado la liberación de péptidos opioides en el ATV y el NAc; la nicotina estimula a los receptores nicotínicos colinérgicos en el ATV y el NAc y los cannabinoides estimulan a sus receptores en las mismas regiones, la nicotina y los cannabinoides aumentan la liberación de DA en el NAc a través de mecanismos locales y/o al actuar dentro del ATV (Meyer & Quenzer, 2019b; Volkow *et al.*, 2019). Los psicoestimulantes como la cocaína y las anfetaminas producen una liberación de DA mayor en comparación con otros tipos de drogas, ya que éstas actúan directamente en las terminales dopaminérgicas del NAc (Di Chiara & Imperato, 1988b; Fiorino *et al.*, 1997).

Las dos anfetaminas mejor caracterizadas son la anfetamina y la metanfetamina (Met) y ambas poseen un alto potencial adictivo. La Met se sintetiza en una reacción simple de reducción a partir de la efedrina y de la pseudoefedrina (alcaloides naturales presentes principalmente en la hierba *Ephedra vulgaris*). La Met se encuentra en forma de sal o cristales y ambas presentaciones son altamente hidrosolubles. Las acciones de la Met son rápidas ya que alcanza su pico máximo de concentración en plasma entre 5 - 10 min después de ser administrada sistémicamente, la duración de sus efectos es dependiente de la dosis y la vida media en roedores es de aproximadamente 1 h (Melega *et al.*, 1995; Gentry *et al.*, 2004).

La Met es un agonista dopaminérgico de acción indirecta, es decir que no actúa directamente sobre los receptores dopaminérgicos. En realidad, la Met tiene un mecanismo de acción complejo pues actúa a través de varios blancos moleculares, sus acciones mejor descritas son sobre el VMAT2 y el DAT (Fig. 4). La Met ingresa a las terminales de las neuronas dopaminérgicas por difusión pasiva y como sustrato del DAT; esta última característica se relaciona con su similitud estructural con la DA. Una vez que está en el citoplasma, es sustrato del VMAT2 y provoca la redistribución de la DA, translocando la DA almacenada en las vesículas citoplasmáticas hacia el citoplasma neuronal. La DA no vesiculada del citoplasma se libera masivamente al espacio

extracelular, por un mecanismo diferente a la exocitosis, debido a que la Met genera el transporte reverso del DAT. Por último, la DA del espacio extracelular no puede reciclarse debido a que el sistema de recaptación (DAT) se encuentra bloqueado por la misma Met (Sulzer *et al.*, 2005; Izawa *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2018; Reith & Gnegy, 2020). La consecuencia de esta serie de acciones es que las concentraciones de DA en el espacio sináptico permanecen elevadas en niveles no biológicos y por periodos prolongados. La Met también es sustrato de los transportadores de serotonina y noradrenalina (SERT y NET), y de manera similar al DAT, invierte el funcionamiento del SERT y del NET lo que produce el aumento de las concentraciones de serotonina y noradrenalina (Rothman *et al.*, 2001); sin embargo, la afinidad de Met por SERT y NET es menor que por DAT (Rothman & Baumann, 2003).

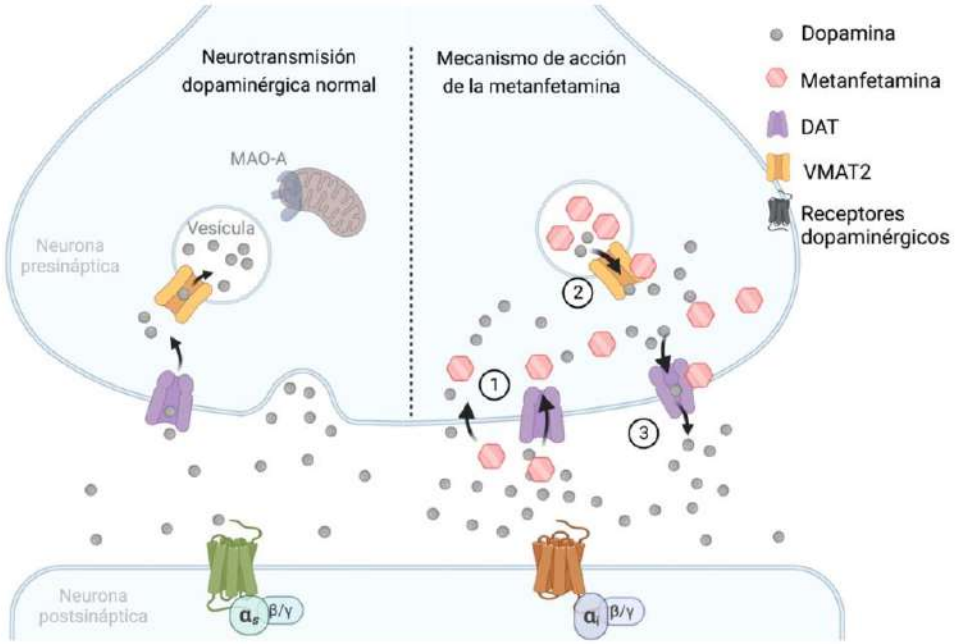

Figura 4. Mecanismo de acción de la metanfetamina. Comparación entre la transmisión dopaminérgica normal y las acciones de la metanfetamina (Met). (**1**) Ingreso de la Met al citoplasma, (**2**) liberación de dopamina al citoplasma y (**3**) liberación de dopamina al espacio extracelular.

La Met indirectamente promueve la activación de los receptores dopaminérgicos y monoaminérgicos, al aumentar las concentraciones de DA, serotonina y noradrenalina en el espacio sináptico. La activación de dichos receptores produce una serie de efectos fisiológicos que son consistentes entre humanos y roedores (Karch & Drummer, 2016; Daiwile *et al.*, 2022). Entre los principales se encuentran: incrementos en la energía, la atención, la productividad, la sociabilidad y la reducción del apetito y de la fatiga. Dosis altas de Met, de manera aguda, producen efectos adversos que pueden ser letales, como colapso cardiovascular e hipertermia (Brown *et al.*, 2003; Hassan *et al.*, 2016; Reddy *et al.*, 2020). Algunos usuarios de Met reportan que consumen esta sustancia para facilitar la excitación sexual (Berry *et al.*, 2022); el consumo de Met se relaciona con la toma de decisiones de alto riesgo, con agresiones sexuales facilitadas y con una alta incidencia de VIH (Jansen & Theron, 2006; Giorgetti *et al.*, 2017).

Efectos conductuales de la metanfetamina

En roedores, la Met se caracteriza por producir efectos motores, ser altamente recompensante y adictiva (Hiroi & White, 1991; Conti *et al.*, 1997; Gu *et al.*, 2019; Bhimani *et al.*, 2021). Estos efectos están asociados a la activación de receptores principalmente dopaminérgicos en el NAc, el CPu, y la corteza prefrontal medial, es decir los efectos conductuales de la Met se regulan en los sistemas dopaminérgicos del mesencéfalo (Vanderschuren & Kalivas, 2000; Tzschentke, 2007). El aumento de la actividad locomotora o hiperlocomoción inducido por la Met se produce a dosis bajas a moderadas. En cambio, dosis altas (a partir de 3 mg/kg) causan un patrón de activación motora completamente diferente, que se caracteriza por movimientos repetitivos y sin sentido, llamados estereotipias motoras o movimientos estereotipados (Camp *et al.*, 1994; Grilly & Loveland, 2001; Gentry *et al.*, 2004; Hall *et al.*, 2008; Jing, Zhang, & Li, 2014; Jing, Zhang, Li, *et al.*, 2014). Las estereotipias se manifiestan con olfateo, lamido, mordisqueo y balanceo de la

cabeza continuos y anormales, y ocurren en ausencia de locomoción (Fowler, 2010). Los movimientos locomotores y las estereotipias inducidas por Met se regulan en diferentes regiones del estriado, la hiperlocomoción está relacionadas con la liberación de DA que se produce en el NAc, mientras que las estereotipias con su liberación en el CPu (Le Moal & Simon, 1991; Amalric & Koob, 1993).

La Met, a dosis no tóxicas, produce efectos recompensantes; es decir, un estado motivacional placentero. Los efectos recompensantes de la Met y de otras drogas de abuso son subjetivos por lo que se estudian de manera indirecta por las conductas que provocan (Mueller & de Wit, 2011). Uno de los paradigmas más utilizados para este propósito es la preferencia de lugar condicionada (PLC; o *conditioned place preference*: CPP). En la prueba de PLC los roedores aprenden a asociar un contexto particular con la experiencia recompensante que produce la droga. Los contextos son diferentes entre sí por claves neutras para facilitar las asociaciones. En consecuencia, los animales pasan más tiempo en el compartimento donde recibieron la droga en comparación con el tiempo que pasan en donde recibieron solución salina. La Met administrada en roedores por diferentes vías induce consistentemente la PLC en un amplio rango de dosis; por ejemplo, por vía sistémica, dosis entre 0.125 – 5.6 mg/kg de Met inducen la PLC (Schindler *et al.*, 2002; Zakharova *et al.*, 2009; Thorn *et al.*, 2012; Taslimi *et al.*, 2018). La administración intra-accumbens de agonistas dopaminérgicos, incluidos no selectivos y selectivos de los D1R y D2R, induce de manera consistente la PLC, mientras que antagonistas dopaminérgicos intra-NAc disminuyen o bloquean las propiedades recompensantes de drogas de abuso administradas por vía sistémica (Tzschentke, 1998; Shizgal & Hyman, 2013). Por lo tanto, los receptores dopaminérgicos del NAc son críticos para evaluar los efectos recompensantes de fármacos en esta prueba.

Hay evidencias que señalan una doble disociación entre las subregiones core y en shell del NAc, y respecto a la actividad locomotora y el efecto

recompensante inducidos por anfetamina en ratas (Carr *et al.*, 1988; Sellings & Clarke, 2003); el NAc *shell* contribuye a los efectos recompensantes (Sackett *et al.*, 2017) y el NAc *core* participa en la hiperlocomoción (Boye *et al.*, 2001). Sin embargo, hay algunos estudios que indican que las funciones de cada región no están claramente segregadas (Pierce & Kalivas, 1995; Parkinson *et al.*, 1999)

Neuroplasticidad inducida por la exposición repetida a metanfetamina

El consumo frecuente de psicoestimulantes puede cambiar el funcionamiento del sistema nervioso central en general, y del sistema mesolímbico en particular. En roedores, la exposición repetida a drogas tipo anfetamina puede producir rápidamente sensibilización, tolerancia, dependencia y adicción. El término sensibilización tiene dos sentidos en el área de la farmacología. La sensibilización conductual se refiere al aumento progresivo de una respuesta conductual con administraciones repetidas de una misma dosis del fármaco y a la hipersensibilidad conductual de animales que fueron expuestos a un fármaco en el pasado. Por otro lado, la sensibilización neuronal se refiere al aumento de una respuesta celular por administraciones repetidas de un fármaco. Presumiblemente a la sensibilización conductual le subyace la sensibilización neuronal; es decir, que la respuesta conductual exacerbada se debe a que el fármaco provoca adaptaciones a largo plazo que facilitan la activación de los sistemas neuronales (Robinson, 2010; Becker *et al.*, 2013). Uno de los cambios más estudiados, y que es común a drogas como el etanol, la morfina y los psicoestimulantes, es el cambio que ocurre en el tono y liberación de DA en el sistema mesolímbico. Por ejemplo, después de un tratamiento prolongado con anfetamina, las concentraciones basales de DA se reducen en el NAc y ese pre-tratamiento con anfetamina aumenta o sensibiliza la liberación de este neurotransmisor ante un reto farmacológico (Rossetti *et al.*, 1992). Otras adaptaciones, como modificaciones en la expresión y funcionamiento de los receptores dopaminérgicos y en otros sistemas de

neurotransmisión, también están relacionadas con la sensibilización neuronal (Vanderschuren & Kalivas, 2000; Robinson, 2010). A pesar de que hay mucha información sobre las neuroadaptaciones asociadas a la sensibilización, no se ha entendido por completo las relaciones causa-efecto de este fenómeno (Robinson, 2010).

La sensibilización conductual se estudia típicamente mediante el paradigma de sensibilización locomotora. En esta prueba se evalúa la actividad locomotora de los roedores después de administrar repetidamente una misma dosis de un fármaco; los animales aumentan gradualmente su respuesta motora con cada administración y esta respuesta exacerbada se mantiene por un plazo largo. Estos efectos se inducen con varios tipos de drogas de abuso, como psicoestimulantes, opioides, etanol, nicotina e inhalables (Kalivas *et al.*, 1993; Domino, 2001; Lessov *et al.*, 2001; Trujillo *et al.*, 2004; Páez-Martínez *et al.*, 2020). La prueba se divide en dos, fase de desarrollo y fase de expresión. En la primera, la droga de abuso se administra repetidamente, en días consecutivos o alternados, hasta que la respuesta es mayor que la producida en la primera administración. La segunda fase se realiza después de varios días o semanas de suspender el fármaco, y consiste en retar a los roedores con una dosis igual o menor a la utilizada en el pre-tratamiento. Aquellos animales sensibilizados expresan mayor locomoción que los que reciben por primera vez el fármaco (Pierce & Kalivas, 1997; Becker *et al.*, 2013). Se ha propuesto que la sensibilización locomotora se acompaña del aumento en el efecto recompensante de la droga (Becker *et al.*, 2013; Siciliano *et al.*, 2015). Las neuroadaptaciones que están relacionadas con el desarrollo y expresión de la sensibilización locomotora inducida por anfetaminas incluyen: cambios en el tono dopaminérgico, en la señalización y sensibilidad de los receptores D1R y D2R y en las propiedades fisiológicas de las neuronas del NAc, del ATV, y de la corteza prefrontal (Vanderschuren & Kalivas, 2000; Scholl *et al.*, 2009; Steketee & Kalivas, 2011; Wang *et al.*, 2017; Gatica *et al.*, 2020).

Interacción entre la actividad sexual y las anfetaminas

En general, los estímulos que producen una estimulación excesiva del sistema mesolímbico, independientemente de su naturaleza, promueven alteraciones en la fisiología normal de las neuronas que regulan este sistema (Lüscher & Malenka, 2011). Como se ha mencionado, la actividad sexual y las drogas tipo anfetamina activan y modifican el sistema mesolímbico. Sin embargo, son pocos los trabajos que abordan la influencia de la actividad sexual sobre los efectos de las anfetaminas, y viceversa. Estos estudios se enfocan en la interacción de dichos estímulos a nivel conductual. Por ejemplo, se ha reportado que la Met deteriora la motivación y ejecución de la cópula de ratas macho sexualmente experimentadas y *naïve* (Frohmader *et al.*, 2010); por el contrario, la ratas que tienen experiencia sexual expresan una facilitación en las conductas motoras y recompensantes inducidas por anfetamina (Pitchers *et al.*, 2010, 2014). Estas evidencias sugieren que la Met deteriora la conducta sexual, mientras que la actividad sexual sensibiliza los efectos conductuales de la anfetamina. Por lo tanto, las anfetaminas y la conducta sexual pueden alterarse el uno al otro, aunque no necesariamente en el mismo sentido.

Las ratas que pasan por una sesión de cópula hasta la saciedad presentan cambios a nivel del sistema mesolímbico (Garduño-Gutiérrez *et al.*, 2013a, 2013b; Guadarrama-Bazante *et al.*, 2014; Canseco-Alba & Rodríguez-Manzo, 2016; Rodríguez-Manzo & Canseco-Alba, 2017; Guadarrama-Bazante & Rodríguez-Manzo, 2019; Rodríguez-Manzo *et al.*, 2021), en particular, niveles bajos de DA en el NAc 24 h después de la saciedad sexual (Canseco-Alba *et al.*, 2022), que podría hacerlas más vulnerables a los efectos de las anfetaminas. En modelos farmacológicos, la hipodopaminergia es uno de los signos de sensibilización neuronal en el NAc, y bajo dicho estado, un reto farmacológico produce la liberación exacerbada de DA (Rossetti *et al.*, 1992). Esto lleva a pensar que es posible que las ratas macho sexualmente saciadas sean particularmente reactivos a los efectos conductuales de la Met y que estos efectos conductuales estén acompañados de cambios en la densidad de los receptores dopaminérgicos y del DAT en las regiones del estriado. Indagar

en este tema puede llevar a la identificación de neuroadaptaciones que participen en el procesamiento anormal de los estímulos recompensantes.

Planteamiento del problema

Los estímulos recompensantes naturales, como la conducta sexual, y los estímulos recompensantes farmacológicos, como las drogas de abuso, activan al circuito mesolímbico dopaminérgico (circuito de la recompensa).

La cópula repetida que tiene lugar durante el desarrollo de la saciedad sexual produce un aumento sostenido y prolongado en las concentraciones de DA en el NAc, como resultado de la activación constante de las neuronas dopaminérgicas del sistema mesolímbico. Ello produce cambios conductuales y fisiológicos de larga duración, que sugieren fenómenos de plasticidad cerebral, pero que son reversibles.

Por otro lado, las drogas psicoestimulantes como la Met también activan al sistema mesolímbico de forma intensa y producen un aumento desmedido en las concentraciones de DA en el NAc, que dan por resultado cambios plásticos que no son reversibles.

Es posible que algunos de los mecanismos involucrados en la inducción de plasticidad neuronal sean comunes a ambos tipos de estimulación, por lo que los cambios cerebrales inducidos por uno de ellos pudieran influir en el desarrollo de las alteraciones neuronales producidas por el otro tipo de estimulación, modificando los efectos conductuales y las adaptaciones moleculares inducidas por cada uno de estos estímulos por sí mismo.

2. Hipótesis

La estimulación del sistema mesolímbico producida por la Met modificará el desarrollo y el establecimiento de la saciedad sexual, mientras que la estimulación del sistema mesolímbico producida por la cópula hasta la saciedad sexual alterará los efectos motores y recompensantes de la Met. En ambos casos, estos efectos conductuales estarán acompañados de modificaciones en la densidad de los receptores dopaminérgicos y en la expresión del DAT en las subregiones del estriado que modulan estas conductas.

3. Objetivos

Objetivo general

Estudiar la posible interacción entre la activación repetida del sistema mesolímbico por la administración de Met y por la actividad sexual en la inducción de cambios conductuales y celulares producidos por cada uno de estos estímulos.

Objetivos particulares

1. Determinar el efecto de la administración aguda de Met sobre el desarrollo y establecimiento de la saciedad sexual.
2. Analizar si la saciedad sexual modifica la hiperlocomoción inducida por la administración aguda de Met en ratas macho sexualmente expertas.
3. Estudiar si la saciedad sexual modifica la sensibilización locomotora, inducida por la administración repetida de Met en ratas macho sexualmente expertas.
4. Establecer si la saciedad sexual intensa modifica el efecto recompensante de la Met en ratas macho sexualmente expertas.

5. Examinar cambios en la expresión del DAT y de los D1R y D2R en el NAc *shell*, el NAc *core* y el CPu inducidos por la administración de Met o por la cópula hasta la saciedad sexual.

4. Materiales y métodos

4.1 Animales

En todos los experimentos se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar sexualmente expertas (250 - 350g). Para que los machos adquieran experiencia sexual, se les sometió a pruebas copulatorias independientes con hembras sexualmente receptivas cada tercer día, hasta completar 8 sesiones. En cada sesión, las parejas copularon por 30 min, o hasta que el experimentador observó la conducta de eyaculación, lo que ocurriera primero. Las ratas macho que eyacularon en menos de 15 min en al menos 3 de las últimas 5 pruebas se consideraron sexualmente expertos (Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1994).

Se utilizaron ratas hembra (Wistar) intactas, en condiciones de receptividad sexual como estímulos sexuales. La receptividad sexual fue inducida por la inyección secuencial de benzoato de estradiol (13 µg/rata s.c.) seguida 24 h después de progesterona (7 mg/rata, s.c.). Las hembras están sexualmente receptivas 4 h después de la administración de progesterona.

Todos los animales fueron proporcionados por el bioterio del Cinvestav Sede Sur y se mantuvieron en grupos de 8 animales por caja. Una semana antes de utilizar a los animales, se aclimataron al vivario de la Institución bajo un ciclo invertido de luz- oscuridad (12 h/12h, las luces se encendieron a las 10:00 pm) y con temperatura (22 ± 2 ºC) y humedad (50 - 60%) controladas. El agua y alimento estuvieron disponibles *ad libitum*, excepto durante las pruebas conductuales. Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio CICUAL-CINVESTAV (protocolo 0230-16), que cumple con las regulaciones establecidas en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

4.2 Fármacos

Se utilizó clorhidrato de metanfetamina (pureza confirmada por espectrometría infrarroja por transformada de Fourier), donado por la Secretaría de Salud (Ciudad de México, México). El fármaco se disolvió en solución salina (0.9%) y siempre fue preparado antes de su uso. La Met se administró vía intraperitoneal (i.p.) en los tratamientos agudos y vía subcutánea (s.c.) para administraciones repetidas. Ésta última se eligió para evitar el mínimo dolor o incomodidad de los animales ante las frecuentes administraciones (Gentry *et al.*, 2004; Cloutier *et al.*, 2014). La Met se utilizó en un rango de dosis de 0.03 a 4 mg/kg, en cada diseño experimental se especifican. En ambos casos, el volumen de administración fue de 1 ml/kg. El pentobarbital sódico (200 mg/kg, i.p., Pisa, Ciudad de México) se utilizó para anestesiar a los animales antes de la extracción de tejido cerebral.

4.3 Actividad sexual

La actividad sexual fue regulada por las ratas macho y se llevó a cabo en cilindros de acrílico transparente (60 × 40 cm) con una cama gruesa de aserrín (10 cm). Cada sesión inició con un periodo de habituación en el cual el macho se colocó individualmente en la arena (5 min) antes de introducir a una hembra receptiva. Después se permitió la interacción sexual espontánea entre la pareja. Dependiendo del propósito de cada experimento, la sesión de actividad sexual concluyó después de que las ratas macho presentaron una eyaculación o de que alcanzaron la saciedad sexual. Algunos de los animales sexualmente saciados se probaron 24 h después.

Cópula hasta una eyaculación

El macho presentó la primera eyaculación y permaneció con la hembra durante el intervalo post-eyaculatorio. La sesión finalizó después de que las ratas macho mostraron la primera intromisión de una segunda serie copulatoria.

Cópula hasta la saciedad sexual

Los animales copularon *ad libitum* y la prueba concluyó cuando las ratas macho alcanzaron el criterio de saciedad sexual, que consiste en que transcurran 90 min sin que el macho eyacule después de la última eyaculación (Rodríguez-Manzo *et al.*, 2011). Los animales fueron regresados a sus cajas de alojamiento al finalizar las pruebas.

Registro de la cópula hasta la saciedad sexual

El paradigma de saciedad sexual se realizó en dos días (Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1994). Durante el desarrollo de la saciedad sexual, primer día, se registraron los siguientes parámetros:

- Latencia de intromisión: tiempo que transcurre entre que la hembra entra a la arena y el macho realiza la primera intromisión de la serie.
- Número de montas y número de intromisiones que preceden a cada eyaculación.
- Latencia de eyaculación: tiempo que transcurre entre la primera intromisión y la eyaculación de cada serie.
- Intervalo post-eyaculatorio: tiempo que transcurre entre de la eyaculación de una serie y la primera intromisión de la siguiente serie.
- Número de eyaculaciones que preceden a la saciedad sexual.
- Latencia a la saciedad sexual: tiempo que transcurre desde que ocurre la primera intromisión hasta la última eyaculación de la sesión de cópula hasta la saciedad.

Los parámetros de los animales tratados con el fármaco se compararon con el de los animales tratados con el vehículo; adicionalmente, se compararon el número de montas e intromisiones, la latencia de eyaculación y el intervalo post-eyaculatorio de la segunda, tercera y última serie de cada sujeto con aquellos expresados en la primera serie.

A las 24 h post-saciedad, se determinó la capacidad para copular de los machos al ser presentados con nuevas hembras receptivas y se registró si mostraron alguna de siguientes respuestas: monta, intromisión, eyaculación o reinicio de la cópula después de la eyaculación. La prueba finalizó al transcurrir 30 min sin que el macho sexualmente saciado presentara alguna de ellas. El número de animales que expresaron cada una de las respuestas sexuales en un grupo se expresó en porcentajes.

4.4 Prueba de actividad motora

Como ya se mencionó, la actividad motora espontánea permite detectar la activación psicomotora característica de algunas drogas de abuso (Pierce & Kalivas, 2007). La actividad motora fue registrada a través de un actímetro electrónico (Panlab, Barcelona, España), equipado con un marco infrarrojo (16 x 16 haces, 2.5 cm entre cada uno, elevado 3 cm del suelo) y acoplado a una caja de acrílico transparente (45 x 45 x 45 cm). El equipo registra el número de interrupciones de los haces con el programa Sedacom (Panlab, Barcelona, España). El procedimiento inició con la habituación individual de las ratas macho al aparato (30 min) seguido por la administración del fármaco o su vehículo, inmediatamente después de éste se inició la prueba de actividad motora. Se registraron los últimos 9 min de la habituación y los 60 min posteriores a la administración del fármaco, en intervalos de 3 min. En cada intervalo el programa registró cuatro tipos de movimientos: ambulatorios rápidos, ambulatorios lentos, estereotipados rápidos y estereotipados lentos. La suma de los movimientos ambulatorios rápidos y lentos se interpretó como actividad locomotora, mientras que los movimientos estereotipados se obtuvieron de la suma de sus respectivos movimientos rápidos y lentos. Entre cada sesión se limpió cuidadosamente el aparato para evitar estímulos olfativos entre individuos.

4.5 Prueba de sensibilización locomotora

La prueba de sensibilización locomotora evalúa el incremento progresivo de la actividad locomotora en respuesta a la administración repetida de una misma dosis del fármaco (Phillips *et al.*, 2011). Para esta prueba se utilizaron los actímetros electrónicos que se describieron antes. Previo al inicio de la prueba se realizaron dos sesiones independientes de habituación en un mismo día, separadas por un intervalo de 5 h. En cada sesión, los animales permanecieron individualmente en el actímetro (45 min). El procedimiento comprendió dos fases: 1) desarrollo de la sensibilización locomotora y 2) expresión de la sensibilización locomotora a corto y largo plazos:

- Desarrollo de la sensibilización

En la primera sesión de esta fase, se colocó a los animales de manera individual en el actímetro. Después de 10 min se administró el fármaco e inmediatamente después de la inyección, se regresó a los animales al aparato y se registró su actividad motora por 45 min. Al finalizar la prueba, los animales se regresaron a su caja de alojamiento. Después de un intervalo de 5 h, se realizó la segunda sesión del día, replicando el procedimiento de la primera sesión. Durante los siguientes días consecutivos se repitió el procedimiento hasta completar 10 sesiones, todas las administraciones del fármaco fueron con la misma dosis. En esta prueba se registró únicamente el total de la actividad locomotora desplegada en cada sesión. La actividad locomotora desplegada durante la segunda, cuarta y décima sesiones se comparó con la primera. El incremento significativo de la actividad locomotora después de la primera sesión sugiere que el fenómeno de sensibilización se estableció.

- Expresión de la sensibilización

Después de finalizar la primera fase de la prueba, los animales pre-tratados con la droga pasaron por un periodo de lavado. Durante este tiempo, se evaluó si la sensibilización locomotora siguió expresándose después de un periodo de corto o largo plazo (4 o 14 días, respectivamente). La mitad de los animales

de cada grupo, fueron sometidos a un reto con Met en el día 4 del periodo de lavado (reto 1); la otra mitad de los animales fue sometida al reto en el día 14 (reto 2). En ambas sesiones, se registró la actividad locomotora de la misma manera que se describió antes, pero administrando la mitad de la dosis de Met. Entre cada sesión se limpió cuidadosamente el aparato.

4.6 Prueba de preferencia de lugar condicionada

La prueba de preferencia de lugar condicionada (PLC) evalúa el efecto recompensante de una droga. Esta prueba se realizó en una caja rectangular (60 x 30 x 45 cm), dividida en dos compartimentos por una pared central que contenía una puerta removible (10 x 12 cm). Los compartimentos difirieron entre sí en el color, la iluminación y la textura del piso. Uno estuvo configurado con paredes oscuras, iluminación tenue indirecta y piso de barras de acero; el otro tenía paredes rayadas, luz tenue directa y piso de malla. El procedimiento consistió de tres fases: 1) la habituación y evaluación de la preferencia inicial, 2) el condicionamiento y 3) la evaluación de la preferencia final (Mueller & de Wit, 2011).

- Habituación y preferencia inicial

Se realizaron cuatro sesiones independientes de habituación, dos sesiones al día separadas por un intervalo de 5 h. En cada una de ellas, los animales tuvieron libre acceso a ambos compartimentos por 15 min. La cuarta sesión se videograbó para posteriormente cuantificar el tiempo que pasaron los animales en cada compartimento (evaluación de la preferencia inicial). Se consideró que los animales habían entrado al compartimento cuando la cabeza y los omóplatos cruzaban la puerta central. Se excluyó a los animales que pasaron menos del 30% del tiempo total en alguno de los compartimentos para evitar una preferencia inicial exacerbada.

- Fase de condicionamiento

Se utilizó un diseño sesgado, en el cual la droga se administró en el compartimento donde el animal pasó menos tiempo durante la evaluación de la preferencia inicial (no preferido) y el vehículo en el compartimento opuesto (preferido). Durante la primera sesión del condicionamiento, la mitad de los animales iniciaron el condicionamiento con la administración de la Met e inmediatamente después de la inyección se introdujeron al compartimento no preferido, donde permanecieron durante 30 min. Después de 5 h se realizó la segunda sesión de condicionamiento del día, en ésta el vehículo fue administrado inmediatamente antes de introducir a los animales al compartimento preferido. Durante los siguientes días se invirtió el orden de las administraciones. En la otra mitad de los animales, la secuencia de las sesiones del condicionamiento con la droga y con el vehículo se alternaron. En todos los grupos se realizaron un total de seis sesiones de condicionamiento, tres con la droga y tres con el vehículo.

- Preferencia final

En esta fase se permitió a los animales el libre acceso a ambos compartimentos (15 min) y se videograbó la prueba para su posterior análisis. El efecto recompensante de la doga fue determinado con el puntaje de la PLC, obtenido a partir de restar el tiempo que pasaron en el compartimento no preferido durante la preferencia inicial, del tiempo que pasaron en el mismo compartimento (asociado con la droga) durante la evaluación de la preferencia final (McKendrick & Graziane, 2020). Valores positivos indican el establecimiento de la PLC y por tanto del efecto recompensante, y valores cercanos a cero sugieren ausencia de este efecto Todas las fases se condujeron bajo ruido blanco (65 dB). Entre cada sesión se limpió cuidadosamente el aparato.

4.7 Procesamiento de las muestras de tejido

Después de 24 h de concluir los experimentos conductuales, los animales fueron sacrificados bajo anestesia profunda. Los cerebros se extrajeron en

menos de 2 min e inmediatamente después se almacenaron en congelación (-80ºC). Se utilizó un criostato (-23ºC; Hyrax C25, Zeiss, Waldorf, Alemania) para realizar cortes coronales (150 µm) que contuvieran las tres subregiones del estriado: NAc *shell*, NAc *core* y CPu (2.52 a 0.84 mm relativo a bregma) con base en un atlas de cerebro de rata (Paxinos & Watson, 2009). En cada rebanada se obtuvieron muestras del NAc *shell*, NAc *core* y CPu de ambos hemisferios con ayuda de sacabocados de diámetro adecuado para cada subregión (0.75, 1 y 3 mm, respectivamente; Fine Science Tools Inc., Foster City, CA, USA). Las muestras se homogenizaron en frío, con un buffer que contenía sacarosa (250 mM, Sigma-Aldrich, cat. S-0389), EDTA (1 mM, Sigma-Aldrich, cat. EDS) y Tris (10 mM, Bio-Rad, cat. 1610716) a pH 7.2, suplementado con inhibidores de proteasas (Thermo Fisher, cat. 78430). El volumen del buffer que se agregó a las muestras fue de 100 µl para cada muestra del NAc *core* o *shell* y de 300 µl para el CPu. El tejido se emulsionó (10 pulsos, 5000 rpm, 4ºC) con un homogenizador de tejido (BioSpec Products Inc., cat. 985370, Bartlesville, OK, EUA) adaptado con un mortero tipo teflón (Thomas Scientific, cat. 3432N55, Swedesboro, NJ, EUA). Los homogenizados se centrifugaron (3000 × g 15 min, 4°C; Z233 MK2 Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Alemania) y los sobrenadantes se recuperaron y pasaron por una segunda centrifugación (14,000 × g 30 min, 4°C). Los sobrenadantes de esta última centrifugación se almacenaron para la determinación de proteínas. La concentración de proteínas en cada muestra se determinó con el kit de ensayo de proteínas DC (Bio-Rad, cat. 5000116), en un espectrofotómetro (longitud de onda 750 nm; Epoch Biotek-Instrument, Winooski, VT, EUA). En cada muestra se realizaron cálculos para cargar 22.5 µg de proteína por carril del gel.

4.8 Western Blot

El marcador de peso molecular (Bio-Rad, cat.1610376) y las muestras se diluyeron en buffer Laemmli (Sigma-Aldrich, cat. S3401). Las muestras se

hirvieron por 1 min para las determinaciones del DAT y por 5 min para los D1R y D2R. Las muestras desnaturalizadas se separaron en un gel de poliacrilamida-SDS discontinuo (4 - 7.5%) en frío, por 2.5 h (90 mV; cámara Mini-protean Tetra, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Las proteínas en el gel se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa (0.45 µm; Santa Cruz, cat. SC201706) por 1 h, en frío (100 mV). Las membranas transferidas se lavaron (10 min) con el buffer de fosfato de sodio (BFS) 10 mM, preparado con fosfato de sodio monobásico monohidratado (Sigma-Aldrich, cat. S0751), fosfato de sodio dibásico (Sigma-Aldrich, cat. S3264) y cloruro de sodio 0.9% (Sigma-Aldrich, cat. S9888). Posteriormente, se bloquearon por 60 min en BPS complementado con Tween-20 0.3% (Bio-Rad, cat. 1706531), gelatina de pescado 3% (Sigma-Aldrich, cat. G7765) y leche (Bio-Rad, cat. 1706404) en distintos porcentajes: 0.1% para el D1R; 0.11% para el D2R y la actina; 0.12% para el DAT. Las membranas fueron incubadas en agitación toda la noche, a 4°C, en la solución de bloqueo adicionada con los siguientes anticuerpos primarios: anti-D1R fabricado en ratón (Santa Cruz, cat. sc33660, diluido 1:300), anti-D2R, en conejo (Millipore, cat. AB5084P, 1:1500), anti-DAT, en conejo (Sigma-Aldrich, cat. D6944, 1:1600), anti-β actina, en cabra (Santa Cruz, cat. SC1616, 1:7500). Después de lavados con la solución que contiene BFS/gelatina/Tween-20 (4x, 10 min), las membranas se incubaron en agitación (2 h, temperatura ambiente) en la solución de bloqueo con los siguientes anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano (HRP): burro anti-ratón (cat. 115-035-003, 1:1000 para las determinaciones del D1R), burro anti-conejo (cat. 711-035-152, 1:9000 para las determinaciones del D2R y 1:12,000 para el DAT) y burro anti-cabra (cat. 705-036-147, 1:5000 para la β-actina), todos fabricados por Jackson ImmunoResearch. El marcador de peso molecular se incubó con StrepTactin (Bio-Rad, cat. 161-0380, 1:90,000). Las membranas se lavaron con PBS/ Tween-20 0.1% (4x, 10 min), seguido de lavados con PBS (2x, 5 min). Finalmente, las membranas se incubaron con el kit de quimioluminiscencia (Bio-Rad, cat.170-5061). Los anticuerpos acoplados a las membranos se visualizaron en películas azules de rayos X

(Carestream Health Inc., cat. 6041222, Windsor, CO, EUA). Las películas se digitalizaron y en las imágenes se midieron las densidades ópticas de las bandas utilizando el programa Image Studio Lite 5.2.5 (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, EUA). Las densidades de las proteínas de interés se normalizaron con las densidades de la β-actina. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias.

4.9 Análisis estadístico

Una vez que se confirmó que los datos tenían una distribución normal, se utilizaron pruebas de estadística paramétrica para analizar diferencias entre grupos o tratamientos. El análisis de varianza (ANOVA) de una vía se utilizó para comparar tres grupos independientes. ANOVAs de dos vías se emplearon para comparar los tipos de actividad motora (locomoción o estereotipias), la condición sexual y su interacción (actividad motora × condición sexual); o bien, para comparar el tratamiento, la condición sexual y su interacción (tratamiento × condición sexual). Se utilizaron ANOVAs de medidas repetidas para hacer comparaciones a lo largo del tiempo en un mismo grupo. Se utilizó la prueba de Tukey como prueba *post hoc*. Los datos analizados con estas pruebas se representaron con la media ± el error estándar de la media (EEM).

Los datos que no siguieron la distribución normal fueron analizados con estadística no paramétrica. Se utilizaron ANOVAs de Kruskal-Wallis para comparar tres grupos independientes. La prueba de Friedman se usó para hacer comparaciones entre distintas series copulatorias presentadas por un mismo grupo. Se utilizó la prueba de Dunn como *post hoc*. Los resultados analizados con estadística no paramétrica se representaron con la mediana ± el rango intercuartil. En todas las pruebas consideramos que los valores de $P \leq 0.05$ indicaron diferencias estadísticamente significativas. Se utilizó el programa Prism 8.2.1 (GraphPad, San Diego, EUA) para los análisis estadísticos y las representaciones gráficas.

4.10 Diseño experimental

Todos los procedimientos conductuales se condujeron siempre en los mismos horarios, durante la fase oscura del ciclo y bajo iluminación roja.

Experimento 1. Efecto agudo de la metanfetamina sobre la saciedad sexual

El experimento 1 tuvo por objetivo determinar el efecto que tiene la Met sobre el desarrollo y establecimiento de la saciedad sexual. En el día 1, grupos independientes de ratas sexualmente experimentadas se introdujeron al aparato y recibieron de manera aguda Met (0.5, 1 o 2 mg/kg) o su vehículo (n = 13, cada uno). Inmediatamente después de la inyección se introdujo a la hembra y se registraron los parámetros de la cópula hasta alcanzar el criterio de saciedad sexual (Fig. 5). A las 24 h se registró la conducta sexual en los animales sexualmente saciados.

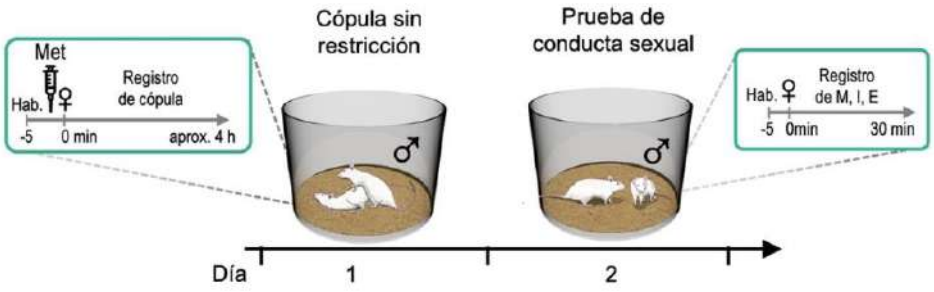

Figura 5. Diseño experimental del experimento 1. Grupos independientes de ratas macho sexualmente expertas fueron administradas con distintas dosis de Met o su vehículo. Inmediatamente después copularon hasta la saciedad sexual. A las 24 h se registró nuevamente su actividad sexual durante 30 min.

Para los siguientes experimentos se utilizaron ratas macho sexualmente expertas con las siguientes condiciones sexuales:

- Grupo control (C): ratas que no tuvieron actividad sexual entre 3 y 4 días previo al experimento y permanecieron en su caja de alojamiento
- Grupo de una eyaculación (1E): ratas que copularon hasta lograr una eyaculación un día antes del experimento

- Grupo sexualmente saciado (S-S): animales que copularon hasta la saciedad sexual un día antes del experimento

Experimento 2. Efecto de la condición sexual sobre la hiperlocomoción inducida por metanfetamina

Para determinar la influencia de la actividad sexual reciente sobre el incremento en la actividad locomotora inducida por Met aguda, animales de cada una de las tres condiciones sexuales (n=8, cada uno) recibieron 0.5, 1, 2, 3 o 4 mg/kg de Met, o su vehículo y se registró su actividad motora por 60 min (Fig. 6). Un día después se extrajeron los cerebros de los grupos tratados con la dosis de 3 mg/kg de Met y con el vehículo (n=3, cada uno) para determinar la densidad de los D1R y D2R, y DAT en las subregiones del estriado: NAc *shell*, NAc *core* y CPu.

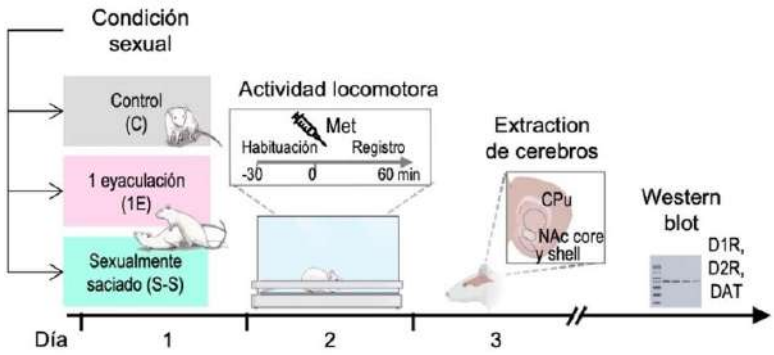

Figura 6 Diseño experimental del experimento 2. Grupos independientes de ratas macho sexualmente expertas que copularon hasta presentar una eyaculación (1E), hasta alcanzar la saciedad sexual (S-S) o que no fueron se sometieron a la actividad sexual, control (C). Al día siguiente todos los animales de las tres condiciones sexuales recibieron, diferentes dosis de Met o su vehículo e inmediatamente después se evaluó su actividad motora por 60 min. Veinticuatro horas más tarde se extrajeron los cerebros para los análisis por western blot.

Experimento 3. Efecto de la condición sexual sobre la sensibilización locomotora inducida por metanfetamina

Para analizar el efecto de la actividad sexual reciente sobre la sensibilización locomotora inducida por Met, primero se habituaron a las ratas sexualmente expertas al actímetro. Posteriormente, todos los animales fueron asignados a

una de las tres condiciones sexuales (n = 8, cada uno) en el día 1. En los siguientes días cursaron la fase de desarrollo de la sensibilización locomotora administrando repetidamente 0.5 mg/kg de Met (10 sesiones, 2 por día) y registrando su actividad locomotora (días 2 a 6). Después del periodo de lavado (4 o 14 días) se realizó la segunda fase de la prueba de sensibilización locomotora en los animales pretratados con la Met. En cada reto se administró 0.25 mg/kg de Met seguido del registro de la actividad locomotora (Fig. 7). Grupos independientes de cada condición sexual sirvieron como control al administrarles el vehículo durante la fase de desarrollo de la sensibilización (n = 8, cada uno). La mitad de estos animales recibieron por primera vez Met (0.25 mg/kg) en el reto 1, mientras que la otra mitad la recibieron durante el reto 2 (grupos no sensibilizados, NS). La locomoción registrada durante cada reto de los animales pretratados con Met se comparó con la locomoción de los animales NS.

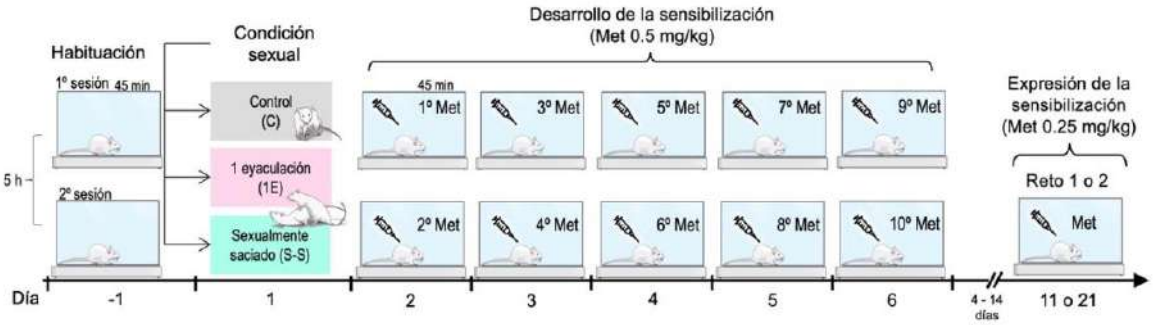

Figura 7. Diseño experimental del experimento 3. Las ratas sexualmente expertas se habituaron al actímetro 24 h antes de ser asignadas a una de las tres condiciones sexuales en el día 1. Al día siguiente iniciaron la fase de desarrollo de la sensibilización locomotora. El desarrollo de la sensibilización consistió en 10 sesiones en total, cada una administrando 0.5 mg/kg de Met, 2 sesiones al día con un intervalo de 5 h. La fase de expresión de la sensibilización se evaluó al retar a los animales pretratados con Met con 0.25 mg/kg del fármaco en el día 11 o 21 del periodo de lavado del fármaco.

Experimento 4. Influencia de la condición sexual sobre el efecto recompensante de la metanfetamina

En este experimento, los animales sexualmente expertos fueron habituados al aparato de la PLC por dos días consecutivos y se evaluó la preferencia inicial.

Posteriormente se generaron las tres condiciones sexuales en el día 1 del experimento. A las 24 h, se inició la fase de condicionamiento, realizando dos sesiones de condicionamiento al día, una de ellas con el vehículo y la otra con la Met (0.03, 0.3 y 3 mg/kg, n=8 por grupo). La fase de condicionamiento se realizó en los días 2 a 4. Después de un día en el cual los animales permanecieron sin manipulación, se evaluó la preferencia final en el día 6 (Fig. 8). Como condición control se utilizaron grupos independientes de cada condición sexual que recibieron solamente vehículo en las seis sesiones de condicionamiento, grupos no condicionados (NC). Los puntajes de la PLC de los animales condicionados con la droga fueron comparados con los puntajes de los animales NC.

Veinticuatro horas después de la evaluación de la preferencia final se extrajeron los cerebros de los animales que fueron condicionados con la dosis de 0.3 mg/kg de Met y los de los grupos NC (n=3, por grupo). Los cerebros se utilizaron para determinar la densidad de D1R y D2R, y DAT en el estriado (el NAc *shell*, el NAc *core* y el CPu).

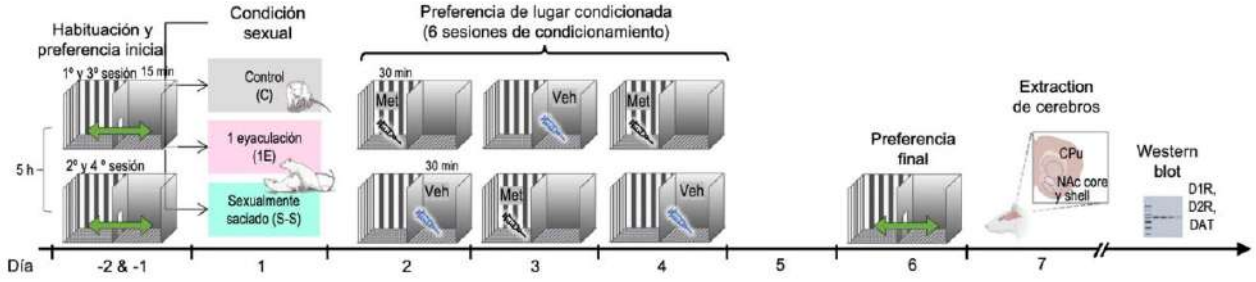

Figura 8. Diseño experimental del experimento 4. Ratas sexualmente expertas se habituaron a los compartimentos del aparato de prueba de la preferencia de lugar condicionada (PLC) y en la última se determinó la preferencia inicial. Después fueron asignados a una de las tres condiciones sexuales en el día 1, y todos los animales cursaron por la 6 sesiones de la fase de condicionamiento, 2 al día con un intervalo de 5 h entre ambas y balanceando el orden entre las administraciones de Met y de vehículo. La preferencia condicionada fue evaluada 48 h después de la última sesión de condicionamiento. Los cerebros de fueron extraídos 24 h después de finalizar la prueba para los análisis por western blots.

5. Resultados

La metanfetamina retrasa el establecimiento de la saciedad sexual

Las figuras 9y 10 muestran los parámetros específicos de la cópula registrados durante la sesión de cópula hasta la saciedad en animales tratados con diferentes dosis de Met o con vehículo. Primero se describen los resultados del grupo tratado con el vehículo para tener una referencia de cómo se desarrollan los parámetros sexuales en la primera, segunda, tercera y última serie copulatoria de los sujetos. Como se puede observar, todos los animales de este grupo presentaron un número de montas menor a 5, de forma consistente, en las distintas series copulatorias. El número de intromisiones fue de alrededor de 10 en la primera serie y se redujo a la mitad a partir de la segunda. La latencia de eyaculación fue de 5 min en la primera serie y en las siguientes series este tiempo disminuyó significativamente en comparación con la primera serie. El intervalo post-eyaculatorio incrementó su duración progresivamente, aumento que fue estadísticamente significativo en la tercera y en la última de las series copulatorias en comparación con la primera serie. La latencia de intromisión fue menor a 1 min, el número de eyaculaciones previas a la saciedad sexual fue de entre 6 y 7 y la latencia a la saciedad sexual en la mayoría de los animales fue de alrededor de 100 min (barras vacías, Fig. 9 y 10).

La Met de manera general aumentó varios de los parámetros de la cópula. La dosis más alta de Met probada (2 mg/kg) produjo los principales efectos (barras rellenas, Fig. 9 y 10). En la primera serie copulatoria, esta dosis aumentó significativamente el número de montas e intromisiones. En la segunda serie, el efecto se mantuvo al continuar expresando un número elevado de montas e intromisiones. Además, en la segunda serie, la latencia de eyaculación aumentó significativamente en comparación con el grupo tratado con el vehículo. Para la tercera serie copulatoria, la latencia de eyaculación fue el único parámetro que se mantuvo aumentado. La dosis más baja que se probó (0.5 mg/kg de Met) únicamente aumentó el número de

intromisiones y la latencia de eyaculación en la tercera serie copulatoria, en comparación con el vehículo. La dosis de 1 m/kg de Met no modificó los parámetros de la cópula en ninguna de las series. Finalmente, no se encontraron diferencias en la latencia de intromisión, ni en el número de eyaculaciones en los grupos tratados con Met con respecto al grupo tratado con vehículo. La dosis alta de Met alargó el tiempo en el que las ratas macho alcanzaron la saciedad sexual.

En la tabla 1 se muestra la proporción de los animales sexualmente saciados pre-tratados con Met o vehículo, que presentaron respuestas copulatorias a las 24 h post-saciedad. En el grupo tratado con el vehículo, la mitad de los animales (46%) eyaculó una vez al presentarles a una nueva hembra receptiva, pero ninguno de ellos reinició la cópula después de esa primera eyaculación. En los grupos pretratados con Met, entre 54 y 62% de los animales saciados eyacularon una vez. Las dosis más altas de Met aumentaron el porcentaje de animales que continuaron copulando después de esa eyaculación, un tercio de ellos reiniciaron la cópula (31%), la cuarta parte presentó una segunda eyaculación (23%) e incluso un macho de cada grupo presentó una tercera eyaculación (8%). Aunque estos porcentajes no fueron estadísticamente significativos respecto del grupo tratado con el vehículo, sobresale que algunos de los animales pre-tratados 24 h antes con Met fueran capaces de presentar hasta tres eyaculaciones sucesivas.

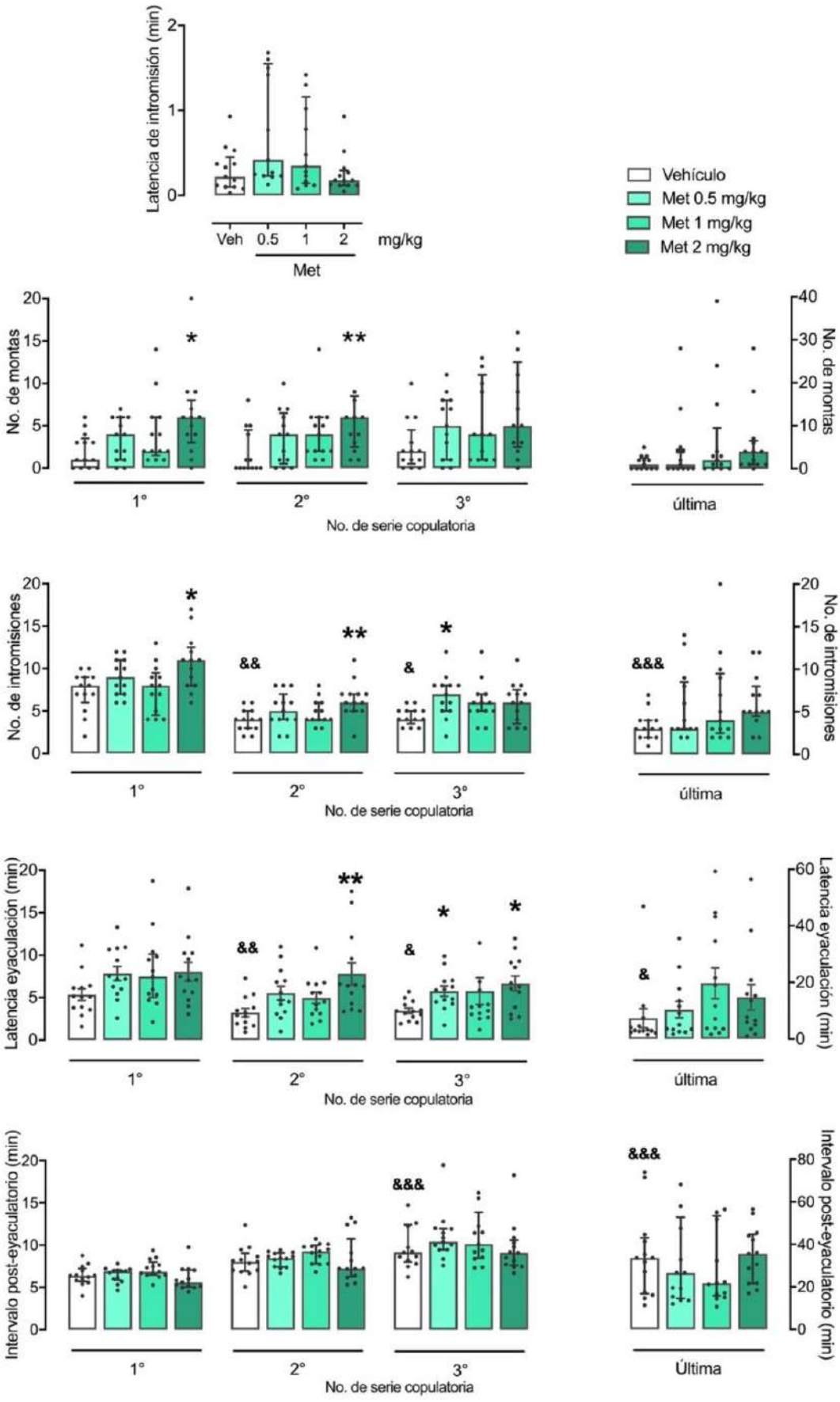
Latencia de intromisión (min)
Veh
0.5
1
2
mg/kg
Met
Vehículo
Met 0.5 mg/kg
Met 1 mg/kg
Met 2 mg/kg
No. de montas
1°
2°
3°
No. de serie copulatoria
última
No. de intromisiones
Latencia eyaculación (min)
Intervalo post-eyaculatorio (min)
Última

Figura 9. Efecto de la administración aguda de diferentes dosis de metanfetamina sobre los parámetros específicos durante el desarrollo de la saciedad sexual. Curvas dosis-respuesta de los parámetros de la cópula de ratas macho tratadas con distintas dosis de Met (0.5 - 2 mg/kg, barras rellenas) en comparación con los del grupo tratado con vehículo (barras vacías). Prueba de Dunn *P < 0.05; **P < 0.01; dosis vs vehículo (ANOVA de Kruskal-Wallis, latencia de intromisión: $H_{(3,48)}$= 8.6, P = 0.036; no. de montas 1ª serie: $H_{(3,48)}$ = 8.1, P = 0.044; 2ª serie: $H_{(3,48)}$ = 10, P = 0.015; 3ª serie: $H_{(3,48)}$ = 6.1, P = 0.106; última serie: $H_{(3,48)}$ = 4.6, P = 0.206; no. de intromisiones: 1ª serie: $H_{(3,48)}$ = 8.7, P = 0.034; 2ª serie: $H_{(3,48)}$ = 11, P = 0.012; 3ª serie: $H_{(3,48)}$ = 9, P = 0.029; última serie: $H_{(3,48)}$ = 5.4, P = 0.14; latencia de eyaculación: 1ª serie: $H_{(3,48)}$ = 6, P = 0.11; 2ª serie: $H_{(3,48)}$ = 12, P = 0.009; 3ª serie: $H_{(3,48)}$ = 10, P = 0.016; última serie: $H_{(3,48)}$ = 5.6, P = 0.131; intervalo post-eyaculatorio: 1ª serie: $H_{(3,48)}$ = 7, P = 0.072; 2ª serie: $H_{(3,48)}$ = 5.8, P = 0.123; 3ª serie: $H_{(3,48)}$ = 3.8, P = 0.283; última serie: $H_{(3,48)}$ = 1.4, P = 0.708; n = 13 por grupo. Prueba de Dunn, $^{\&}P$ < 0.05; $^{\&\&}P$ < 0.01; $^{\&\&\&}P$ < 0.001 no. de serie vs. 1ª serie (ANOVA de Friedman para medidas repetidas, no. montas: Q = 2, P = 0.58; no. intromisiones: Q = 23, P < 0.001; latencia eyaculación: Q = 12, P = 0.008; intervalo post-eyaculatorio: Q = 39, P < 0.001). Los parámetros se expresan como medianas ± rango intercuartil.

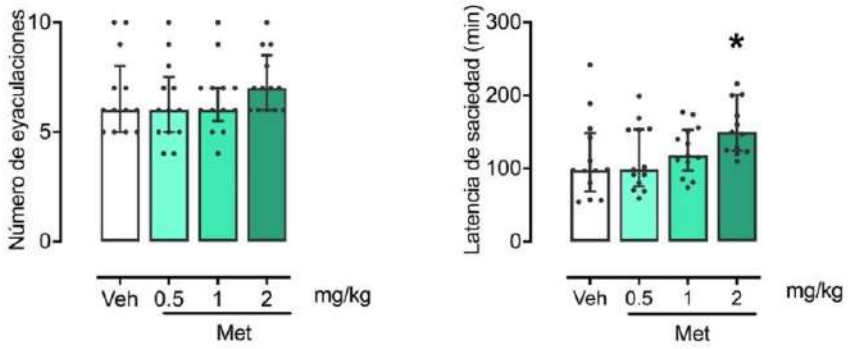

Figura 10. Cambios en curso de la saciedad sexual. Curvas dosis-respuesta de los parámetros de la cópula de ratas macho tratadas con distintas dosis de Met (0.5 - 2 mg/kg, barras rellenas) en comparación con los del grupo tratado con vehículo (barras vacías). Prueba de Dunn *P < 0.05; dosis vs vehículo (ANOVA de Kruskal-Wallis, no. eyaculaciones: $H_{(3,48)}$ = 3.1, P = 0.374; latencia de saciedad: $H_{(3,48)}$ = 9.4, P = 0.024; n = 13 por grupo. Los parámetros se expresan como medianas ± rango intercuartil.

Tabla 1. Proporción y porcentaje de animales sexualmente saciados, pretratados con metanfetamina o el vehículo

		1E		1RC		2E		3E	
	Vehículo	6 / 13	46%	0 / 13	0%	-		-	
Met	0.5 mg/kg	7 / 13	54%	2 / 13	15%	2 / 13	15%	0 / 13	0%
	1 mg/kg	7 / 13	54%	4 / 13	31%	3 / 13	23%	1 / 13	8%
	2 mg/kg	8 / 13	62%	4 / 13	31%	3 / 13	23%	1 / 13	8%

F de Fisher, no significativo. Primera eyaculación (1E); primer reinicio de cópula (1RC); segunda eyaculación (2E); tercera eyaculación (3E).

La actividad sexual aumenta la locomoción inducida por metanfetamina

La figura 11 muestra la actividad locomotora inducida por la administración aguda de distintas dosis de Met. De manera general, todas las dosis aumentaron significativamente el número de desplazamientos en todos los grupos, produciendo curvas dosis respuesta en forma de U invertida (Fig.11a). Es decir, las dosis de 0.5 a 2 mg/kg aumentaron progresivamente la actividad locomotora; sin embargo, con dosis más altas (3 y 4 mg/kg) el aumento de la actividad locomotora fue menor debido a la aparición de movimientos estereotipados. En los grupos C y 1E el efecto máximo de locomoción se alcanzó con 2 mg/kg de Met. En el grupo S-S el efecto máximo de locomoción se produjo con dos dosis de Met: 2 y 3 mg/kg.

Al analizar los cursos temporales en cada grupo se observó que las dosis intermedias a altas de Met (2 - 4 mg/kg) produjeron marcadas diferencias en la locomoción (Fig. 11b). En el grupo C, la dosis de 2 mg/kg de Met elevó la locomoción de manera sostenida durante toda la prueba; 3 mg/kg aumentó la locomoción, pero después de 15 min ésta empezó a decaer hasta reducirse de manera significativa; 4 mg/kg primero produjo un pico de locomoción y después de 15 min la intensidad de las estereotipias aumentó hasta abolir casi por completo la locomoción (panel izquierdo, Fig. 11b). En el grupo de 1E, la Met produjo cursos temporales similares al del grupo C, aunque los efectos

fueron más exacerbados entre las tres dosis (panel central, Fig. 8b). En el grupo S-S no se presentaron diferencias entre las dosis de Met durante los primeros 20 min de la prueba y en el resto de la prueba 2 y 3 mg/kg de Met produjeron una respuesta de locomoción equivalente (panel derecho, Fig. 11b).

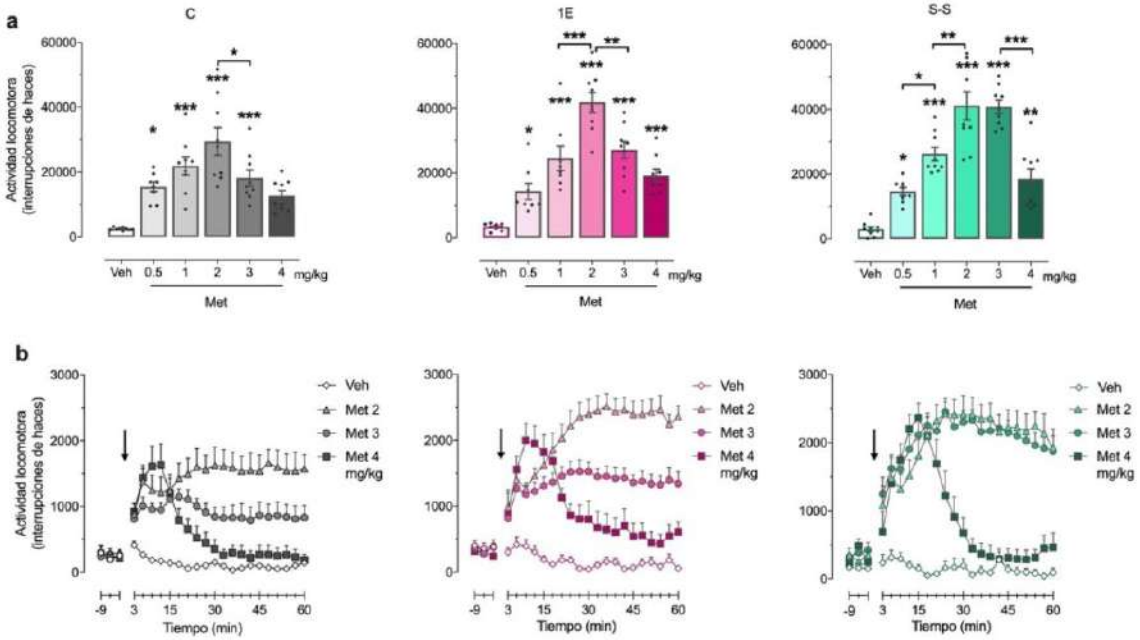

Figura 11. Efectos locomotores inducidos por metanfetamina en animales con diferente condición sexual. (**a**) Curvas dosis-respuesta de los efectos sobre la locomoción producidos por Met (0.5 - 4 mg/kg) o su vehículo (Veh) en ratas macho control (C), con una eyaculación (1E) y sexualmente saciadas (S-S) a lo largo de 60 min. La actividad locomotora se expresa como promedio de interrupciones de los haces de luz. Prueba de Tukey, **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001 Met vs Veh o entre dosis (ANOVAs de una vía, C: $F_{(5, 47)} = 13$, $P < 0.001$; 1E: $F_{(5, 46)} = 27$, $P < 0.001$; S-S: $F_{(5, 47)} = 34$, $P < 0.001$) n = 8 por grupo. (**b**) Cursos temporales de los cambios en la locomoción producidos por dosis de moderadas a altas de Met (2 - 4 mg/kg) o su vehículo (Veh) en los mismos grupos. Las flechas indican el momento de la inyección. La actividad locomotora se expresa como promedio de interrupciones de los haces de luz a intervalos de 3 min y sólo se expresan los EEM positivos para dar claridad a las gráficas **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001 prueba de Tukey (ANOVA de dos vías de medidas repetidas, C: dosis $F_{(2, 23)} = 7.9$, $P = 0.002$; tiempo $F_{(2.9, 66)} = 4.6$, $P = 0.006$; interacción $F_{(38, 437)} = 7.3$, $P < 0.001$; 1E: dosis $F_{(2, 24)} = 20$, $P < 0.001$; tiempo $F_{(2.5, 60)} = 3.2$, $P = 0.036$; interacción $F_{(38, 456)} = 11$, $P < 0.001$; S-S: dosis $F_{(2, 24)} = 15$, $P < 0.001$; tiempo $F_{(3.8, 92)} = 10$, $P < 0.001$; interacción $F_{(38, 456)} = 12$, $P < 0.001$.

La figura 12 compara los movimientos locomotores y las estereotipias inducidas por las dosis más altas de Met (2, 3 y 4 mg/kg) entre los animales con las tres condiciones sexuales. En todos los grupos, la dosis de 2 mg/kg de Met incrementó significativamente la actividad locomotora en comparación con los movimientos estereotipados (Fig. 12a). Al comparar la respuesta de locomoción entre los grupos, las ratas que tuvieron actividad sexual (1E y S-S) se mostraron aproximadamente un tercio más activos que el grupo C durante la mayor parte de la prueba (Fig. 12b).

Con la dosis de 3 mg/kg, los grupos que copularon una vez o hasta la saciedad expresaron una mayor cantidad de movimientos en comparación con la cantidad de estereotipias. En cambio, el grupo C desplegó una cantidad equivalente de ambos tipos de movimientos (Fig. 12a). Al comparar únicamente la locomoción entre los tres grupos, los animales con actividad sexual reciente mostraron una respuesta de hiperlocomoción significativa en comparación con el grupo C, siendo los animales S-S los que mostraron la respuesta máxima; es decir, los que tuvieron mayor sensibilización a la Met. En contraste con los efectos locomotores, la cantidad de movimientos estereotipados no difirió entre los animales de las tres condiciones sexuales. Se compararon los cursos temporales de la actividad locomotora en respuesta a la dosis de 3 mg/kg de Met entre las tres condiciones sexuales. Observamos que la locomoción de los animales S-S fue significativamente más elevada durante la mayor parte de la prueba en comparación con el grupo C (min 9 a 60) y con grupo de 1E (min 12 a 57) (Fig.12b).

Con la dosis de 4 mg/kg no se observaron diferencias entre la actividad locomotora y las estereotipias que expresaron cada uno de los grupos. El análisis de las tres condiciones sexuales indicó que la locomoción no difiere entre ellos. La única diferencia encontrada fue un incremento en las estereotipias del grupo de 1E respecto del grupo C (Fig. 12a). Al analizar el curso temporal de la actividad locomotora se observó que todos los grupos presentaron un pico de locomoción durante los primeros 30 min de la prueba,

que fue de mayor duración en los animales que habían tenido actividad sexual. En particular, las ratas de 1E mantuvieron elevada su locomoción por algunos minutos, antes de descender (15 a 18 min), mientras que en las ratas S-S hiperlocomoción se prolongó por casi 10 min (12 a 21 min) en comparación con el grupo C (Fig. 12b).

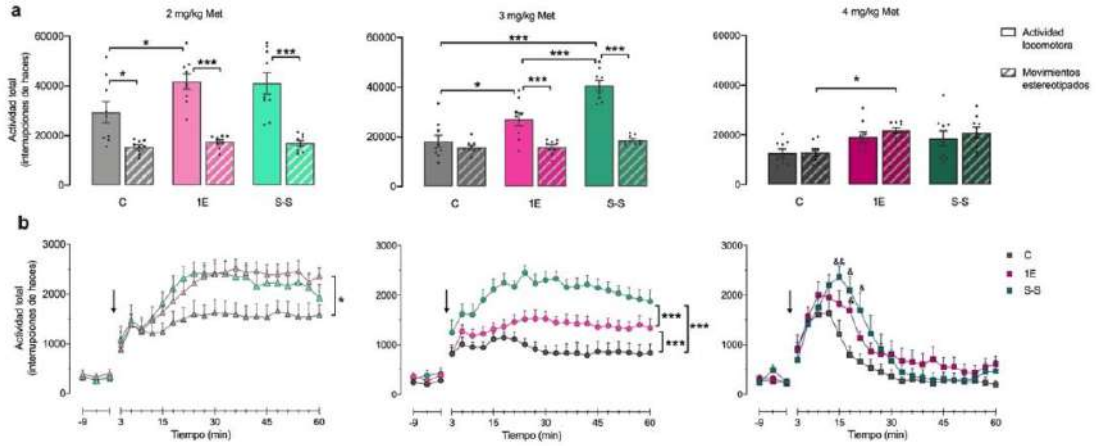

Figura 12. Movimientos locomotores y estereotipados inducidos por la metanfetamina en animales con diferente condición sexual. (**a**) Comparación de la actividad locomotora (barras) y los movimientos estereotipados (achurado) producidos por 2, 3 y 4 mg/kg Met en el grupo control (C), el de una eyaculación (1E) y el sexualmente saciado (S-S). La actividad locomotora se expresa como promedio de interrupciones de los haces de luz. Prueba de Tukey *$P < 0.05$; **$P < 0.01$; ***$P < 0.001$ (Met 2 mg/kg ANOVA de dos vías, condición sexual $F_{(2, 48)} = 3.8$, $P = 0.027$, tipo de actividad motora $F_{(1, 48)} = 78.5$, $P < 0.001$, y su interacción $F_{(2, 48)} = 2.09$, $P = 0.13$. Met 3 mg/kg ANOVA de dos vías, condición sexual $F_{(2, 48)} = 26.2$, $P < 0.001$, tipo de actividad motora $F_{(1, 48)} = 65.8$, $P < 0.001$, y su interacción $F_{(2, 48)} = 15.1$, $P < 0.001$. Met 4 mg/kg ANOVA de dos vías, condición sexual $F_{(2, 47)} = 8.8$, $P < 0.001$,tipo de actividad motora $F_{(1, 47)} = 0.98$, $P = 0.33$, su interacción $F_{(2, 47)} = 0.2$, $P = 0.82$) n = 8 por grupo. (**b**) Curso temporal de la actividad locomotora producida por 2, 3 y 4 mg/kg de Met, expresada por el promedio ± el EEM de interrupciones de haces a intervalos de 3 min. Las flechas indican el momento de la inyección. ***$P < 0.001$; prueba de Tukey (Met 2 mg/kg ANOVA de dos vías de medidas repetidas; condición sexual, $F_{(2, 24)} = 3.08$, $P = 0.064$; tiempo $F_{(4.5, 108)} = 25.9$, $P < 0.001$, su interacción $F_{(38, 456)} = 2.32$, $P < 0.001$. Met 3 mg/kg ANOVA de dos vías de medidas repetidas; condición sexual, $F_{(2, 24)} = 23$, $P < 0.001$; tiempo $F_{(3.4, 82)} = 4.9$, $P = 0.002$, su interacción $F_{(38, 456)} = 1.7$, $P = 0.007$). $^{\&}P < 0.05$; $^{\&\&}P < 0.01$; prueba de Tukey (Met 4 mg/kg ANOVA de dos vías de medidas repetidas, condición sexual $F_{(2, 24)} = 2.6$, $P < 0.098$; tiempo $F_{(2.4, 58)} = 31$, $P < 0.001$; interacción $F_{(38, 456)} = 1.8$, $P = 0.004$.

La actividad sexual favorece el desarrollo y la expresión de la sensibilización locomotora

La figura 13 muestra los resultados obtenidos en la prueba de sensibilización locomotora, producida por administraciones repetidas de Met (0.5 mg/kg, 10x). El grupo C no modificó su actividad locomotora después de cuatro administraciones de Met, y fue hasta la décima administración que se observó un aumento significativo de la actividad locomotora (fig. 13a). En cambio, el grupo de 1E incrementó significativamente su actividad ambulatoria desde la cuarta y hasta la décima administración de Met, en comparación con la actividad registrada después de la primera administración. Las ratas S-S también aumentaron significativamente su locomoción después de la cuarta y hasta la última administración de Met, respecto de la registrada en la primera de ellas. Adicionalmente en este último grupo, el aumento en la locomoción producido por la última administración de Met fue significativamente mayor que el producido por la segunda y la cuarta administraciones. Como se esperaba, el grupo no sensibilizado no modificó su actividad locomotora después de las administraciones del vehículo. No se observaron diferencias entre las condiciones sexuales, ni en la primera ni en la décima de las administraciones del fármaco (fig. 13b).

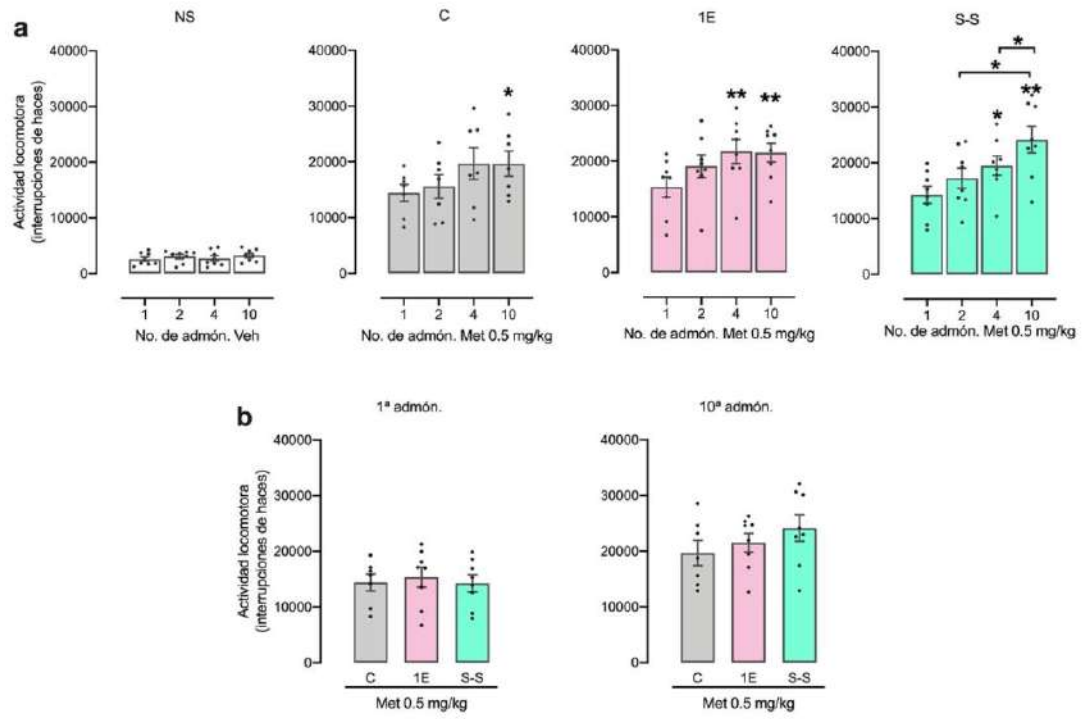

Figura 13. Desarrollo de la sensibilización locomotora inducida por la metanfetamina en animales con diferente condición sexual. (**a**) La sensibilización se indujo con administraciones repetidas, 10 administraciones de Met (0.5 mg/kg) sobre la actividad locomotora de ratas macho control (C), con una eyaculación (1E) y sexualmente saciadas (S-S) a lo largo de 45 min. La actividad locomotora se expresó como el promedio de interrupciones ± el EEM de haces. El grupo no sensibilizado (NS) recibió vehículo (Veh) en cada administración. Prueba de Tukey, $*P < 0.05$; $**P < 0.01$; No. de admón. vs 1 (ANOVAs de medidas repetidas, NS: $F_{(2.4, 17)} = 0.45$, $P = 0.68$; C: $F_{(2.7, 16)} = 7.1$, $P = 0.003$; 1E: $F_{(2.4, 17)} = 10$, $P < 0.001$; S-S: $F_{(2.3, 16)} = 15$, $P < 0.001$) n = 7 - 8 por grupo. (**b**) Comparación de la primera y décima administración de Met entre las tres condiciones sexuales. No significativo (ANOVA de una vía, 1ª admón.: $F_{(2, 20)} = 0.14$, $P = 0.87$; 10ª admón.: $F_{(2, 20)} = 1.1$, $P = 0.35$).

La figura 14 muestra la respuesta locomotora a los dos retos (Met 0.25 mg/kg) realizados en la fase de expresión de la prueba. El grupo C presentó un aumento en la actividad locomotora frente al primer reto en comparación con los animales no sensibilizados. En el segundo reto, las respuestas del grupo C sensibilizado y del grupo no sensibilizado con Met fueron similares. Los animales que tuvieron actividad sexual antes de iniciar la prueba mostraron una actividad locomotora mayor frente a ambos retos en comparación con la que expresaron los grupos no sensibilizados respectivos (Fig. 14a). La locomoción producida durante el primer reto no difiere entre los animales sensibilizados de cada condición sexual, tampoco encontramos diferencias en

el segundo reto entre las tres condiciones sexuales. (Fig. 14b). En conclusión, la actividad sexual favoreció que la sensibilización locomotora inducida por Met se desarrollara con menos administraciones y que continuara expresándose a largo plazo, sin embargo, la intensidad de estimulación sexual no modifica el desarrollo de la sensibilización locomotora, ni su expresión a corto o largo plazo.

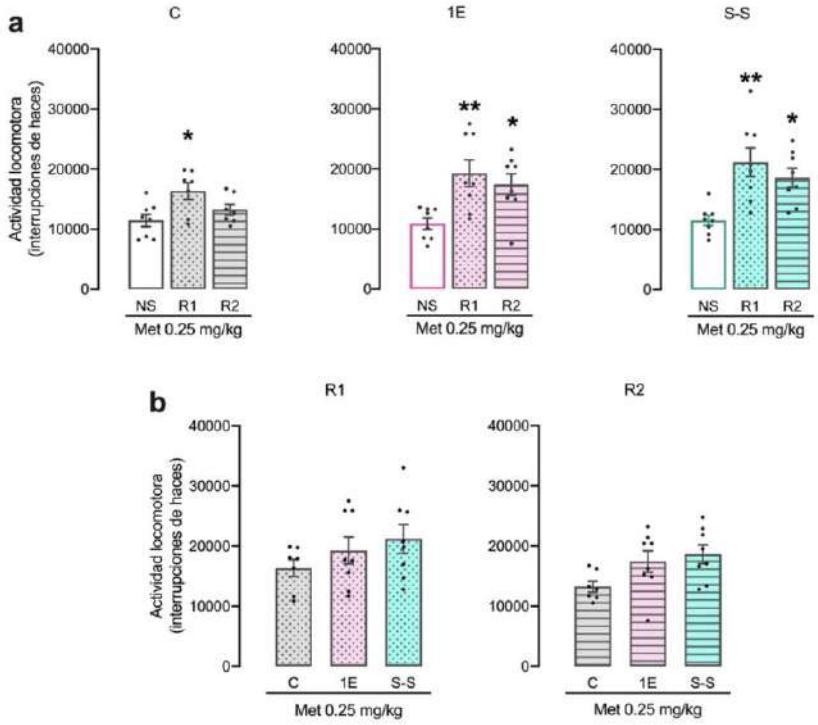

Figura 14. Expresión de la sensibilización locomotora inducida por metanfetamina en animales con diferente condición sexual. **(a**) Expresión de la sensibilización a corto plazo, reto 1 (R1) y a largo plazo, reto 2 (R2) en ratas macho control (C), con una eyaculación (1E) y sexualmente saciadas (S-S), en comparación con los grupos no sensibilizados (NS). En todos los grupos se administró Met 0.25 mg/kg. La actividad locomotora está expresada como el promedio ± el EEM de interrupciones de los haces de luz, a lo largo de 45 min. Prueba de Tukey, **P* < 0.05; ***P* < 0.01; R1, R2 vs NS (ANOVAs de una vía, C: $F_{(2, 19)}$ = 4.9, *P* = 0.019; 1E: $F_{(2, 21)}$ = 6.5, *P* = 0.006; S-S: $F_{(2, 21)}$ = 8.6, *P* = 0.002) n = 8 por grupo. (**b**) Comparación de la expresión de la sensibilización en el reto 1 y el reto 2 entre las tres condiciones sexuales. No significativo (ANOVA de una vía, R1: $F_{(2, 20)}$ = 1.3, *P* = 0.29; R2: $F_{(2, 20)}$ = 3.4, *P* = 0.06).

La saciedad sexual potencia el efecto recompensante de la metanfetamina

La figura 15 muestra la influencia de las diferentes condiciones sexuales sobre la PLC inducida por Met. En las ratas C todas las dosis de Met produjeron PLC con puntajes muy similares entre ellas. En el grupo de 1E sólo la dosis de 0.3 mg/kg de Met indujo PLC. Y en el grupo de ratas S-S, la Met produjo PLC a todas las dosis probadas y la curva dosis respuesta siguió una forma de U invertida. Es decir, que la dosis de 0.3 mg/kg produjo el puntaje más alto y la dosis de 3 mg/kg produjo un puntaje significativamente menor (Fig. 15a).

Las curvas dosis respuesta hicieron evidente que, si bien la dosis intermedia de Met (0.3 mg/kg) fue recompensante para todos los grupos, no produce los mismos efectos en todas las condiciones sexuales. La comparación entre los grupos mostró que, con esa dosis en particular, los animales S-S expresan el puntaje máximo en la PLC y éste es significativamente mayor al que expresó el grupo C (Fig. 15b). Es decir, la Met es más recompensante en los animales S-S.

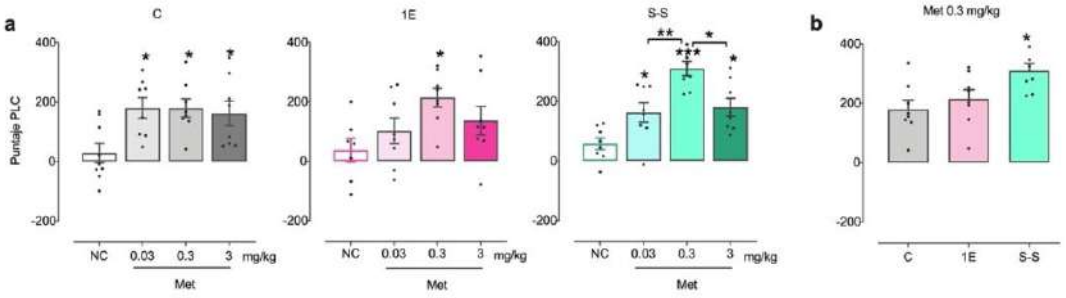

Figura 15. Efectos recompensantes inducidos por metanfetamina en animales con diferente condición sexual. (**a**) Curvas dosis respuesta producidas por Met (0.03 - 3 mg/kg) sobre la PLC en ratas macho control (C), con una eyaculación (1E) y sexualmente saciadas (S-S) en comparación con los grupos no condicionados (NC). El puntaje de la PLC se expresa como el promedio ± el EEM. C: prueba de Tukey, **P* < 0.05 dosis vs NC (ANOVA de una vía, $F_{(3, 29)} = 4.6$, $P = 0.009$). 1E: prueba de Tukey, **P* < 0.05 dosis vs NC (ANOVA de una vía, $F_{(3, 27)} = 3.1$, $P = 0.04$). S-S: prueba de Tukey, **P* < 0.05; ** *P* < 0.01; *** *P* < 0.001 dosis vs NC (ANOVA de una vía $F_{(3, 28)} = 15$, $P < 0.001$) n = 8 por grupo. (**b**) Comparación entre las tres condiciones sexuales de los puntajes promedios ± el EEM con la dosis de 0.3 mg/kg de Met. Prueba de Tukey, **P* = 0.012 comparaciones entre grupos (ANOVA de una vía, $F_{(2, 21)} = 5.4$, $P = 0.013$).

Evaluación de la expresión de los D1R, D2R y del DAT en regiones estriatales de animales tratados con metanfetamina o que tuvieron actividad sexual

Con el propósito de establecer la expresión de los principales componentes del sistema dopaminérgico en los diferentes grupos experimentales, se evaluaron los cambios en la expresión de los D1R, D2R y DAT en las distintas regiones del estriado inducidos por la administración aguda o repetida de Met, por la actividad sexual o en respuesta a la combinación de ambos estímulos. Estos cambios se muestran en las figuras 16 y 17 y en las tablas 2 y 3. En todos los casos, las bandas de los anticuerpos que reconocen a las proteínas dopaminérgicas se expresaron en los pesos moleculares esperados, una banda de ~50 kDa para el D1R (Almanza *et al.*, 2019), dos bandas de ~75 y ~100 kDa para el D2R (Chauhan *et al.*, 2014; Stojanovic *et al.*, 2017) y tres bandas para el DAT, una de ~55 kDa correspondiente a la proteína y otras dos de ~65 y ~68 kDa relacionadas con modificaciones postraduccionales del DAT (Luis-Ravelo *et al.*, 2021).

La figura 16 muestra la expresión de D1R, D2R y DAT en NAc *shell*, NAc *core* y CPu en respuesta a la estimulación aguda de 3 mg/kg de Met y a la estimulación sexual reciente (-2 días). Este análisis tuvo tres propósitos; primero, explorar, por primera vez, el estado de los receptores y del transportador de DA estriatales después de que se experimenta la actividad sexual; segundo, hacer una comparación de los cambios que se producen por un estímulo natural y por una droga de abuso; y tercero, averiguar si los cambios moleculares producidos por la actividad sexual tienen el potencial de volver a estos animales más vulnerables a los efectos conductuales de la Met. Si bien las comparaciones pueden ser múltiples y se analizan más adelante, cabe destacar que cada estímulo produjo cambios diferenciales. La actividad sexual fue capaz de alterar la expresión de ciertas proteínas en el NAc core y en el CP, pero no en la región shell del NAc. De manera inversa, la Met sí cambió la expresión de los D2R en NAc *shell*, y no afectó la expresión de proteínas en el NAc core y CP. En la tabla 2 se muestran los resultados de los

ANOVAs y únicamente se resaltan los valores de *P* que fueron estadísticamente significativos en las pruebas *post hoc*.

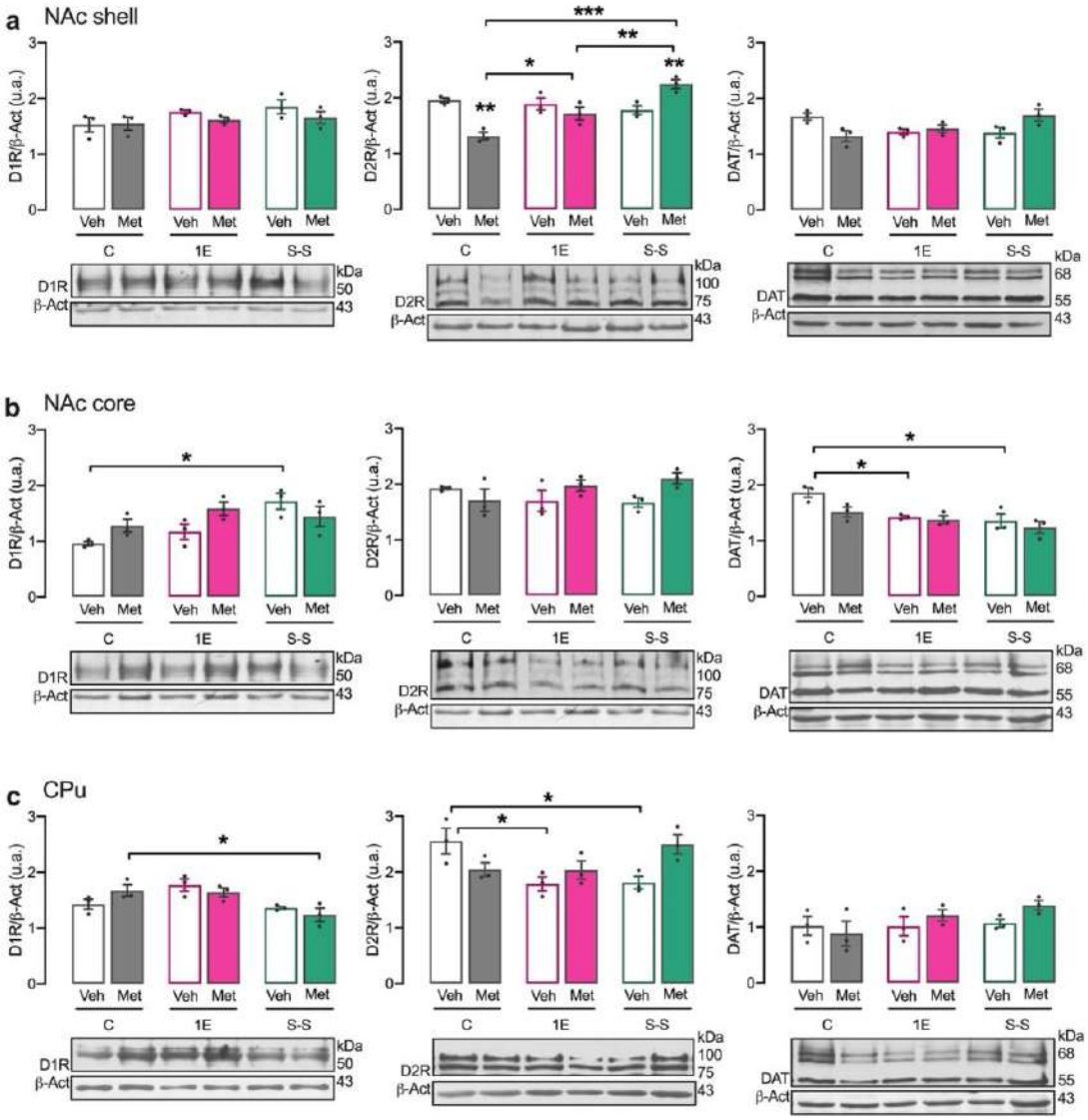

Figura 16. Efecto de la administración aguda de metanfetamina y de la condición sexual sobre la expresión de los receptores y del transportador a dopamina en diferentes regiones del estriado de ratas macho. Expresión del receptor a dopamina D1 (D1R), del receptor a dopamina D2 (D2R) y del transportador de dopamina (DAT) en el (**a**) núcleo accumbens shell (NAc shell); (**b**) el núcleo accumbens core (NAc core) y (**c**) el núcleo caudado-putamen (CPu) de ratas control (C), con una eyaculación (1E) o sexualmente saciadas (S-S), condicionadas con Met (3 mg/kg) o no condicionadas (NC, vehículo). Las determinaciones se realizaron 24 h después de la administración de Met y 2 días después de la actividad sexual. Los datos se expresan como proporción entre la densidad óptica de la proteína de interés y la de la β-Actina (β-Act) en unidades arbitrarias (u.a.), (n=3 ratas por grupo). Debajo de las

gráficas se presentan imágenes representativas de las bandas. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; prueba de Tukey.

Tabla 2. Parámetros de los ANOVAs de dos vías parámetros correspondientes a la figura 16

		Met (3 mg/kg)	Condición sexual	Met × condición sexual
NAc shell	D1R	$F_{(1,12)} = 1.7$; $P = 0.22$	$F_{(2,12)} = 2.5$; $P = 0.13$	$F_{(2,12)} = 0.62$; $P = 0.55$
	D2R	$F_{(1,12)} = 2.75$; $P = 0.12$	$F_{(2,12)} = 9.69$; $P = 0.003$	$F_{(2,12)} = 20.9$; $P < 0.001$
	DAT	$F_{(1,12)} = 0.01$; $P = 0.92$	$F_{(2,12)} = 0.98$; $P = 0.403$	$F_{(2,12)} = 8.53$; $P = 0.005$
NAc core	D1R	$F_{(1,12)} = 2.1$; $P = 0.175$	$F_{(2,12)} = 6.3$; $P = 0.013$	$F_{(2,12)} = 4.1$; $P = 0.044$
	D2R	$F_{(1,12)} = 2.4$; $P = 0.15$	$F_{(2,12)} = 0.15$; $P = 0.87$	$F_{(2,12)} = 3.4$; $P = 0.069$
	DAT	$F_{(1,12)} = 5.6$; $P = 0.036$	$F_{(2,12)} = 11$; $P = 0.002$	$F_{(2,12)} = 1.6$; $P = 0.24$
CPu	D1R	$F_{(1,12)} = 0.07$; $P = 0.80$	$F_{(2,12)} = 11$; $P = 0.002$	$F_{(2,12)} = 2.3$; $P = 0.15$
	D2R	$F_{(1,12)} = 2.7$; $P = 0.12$	$F_{(2,12)} = 1.5$; $P = 0.25$	$F_{(2,12)} = 8.1$; $P = 0.006$
	DAT	$F_{(1,12)} = 1.1$; $P = 0.31$	$F_{(2,12)} = 1.8$; $P = 0.208$	$F_{(2,12)} = 1.3$; $P = 0.31$

La figura 17 muestra los niveles de expresión de D1R, D2R y DAT en las distintas regiones del estriado en respuesta a la administración repetida de una dosis baja de Met (0.3 mg/kg) en animales que tuvieron diferentes tipos de actividad sexual 6 días antes de la medición. Al igual que en el caso anterior, las comparaciones posibles son numerosas y se analizan con detalle más adelante, no obstante cabe destacar que la administración repetida de Met sólo aumentó la expresión de DAT en NAc *shell* y no tuvo ningún otro efecto significativo, ni en la expresión de este transportador ni en la de los receptores a DA. Los resultados de los análisis estadísticos derivados de las comparaciones entre los distintos grupos tratados repetidamente con Met se presentan en la tabla 3.

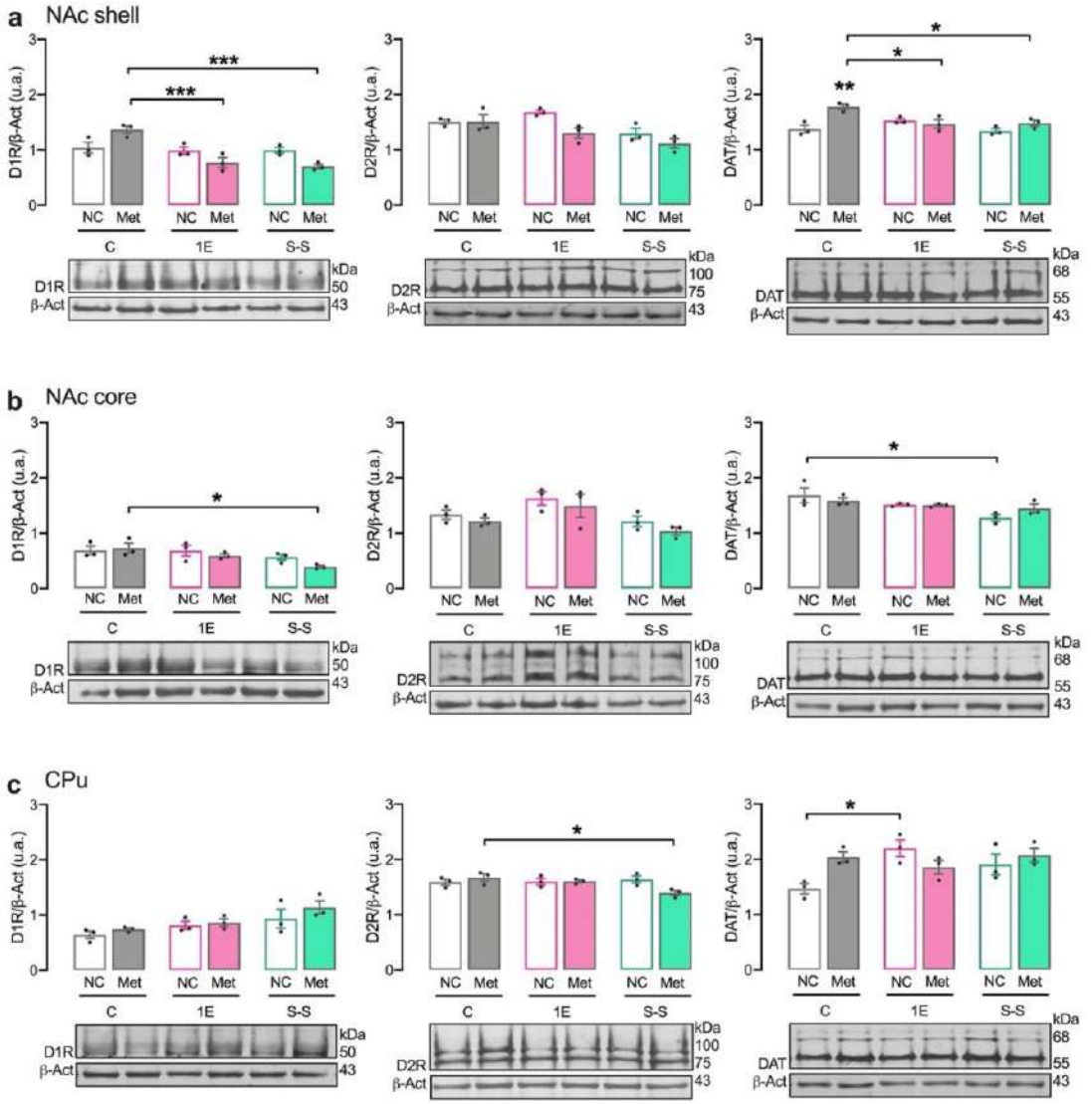

Figura 17. Efecto de la administración repetida de metanfetamina y de la condición sexual sobre la expresión de los receptores y del transportador a dopamina en diferentes regiones del estriado de ratas macho. Expresión del receptor a dopamina D1 (D1R), del receptor a dopamina D2 (D2R) y del transportador de dopamina (DAT) en el (**a**) núcleo accumbens shell (NAc shell); (**b**) el núcleo accumbens core (NAc core) y (**c**) el núcleo caudado-putamen (CPu) de ratas control (C), con una eyaculación (1E) o sexualmente saciadas (S-S), condicionadas con Met (0.3 mg/kg) o no condicionadas (NC, vehículo). Las determinaciones se realizaron 72 h después de terminar el tratamiento y 6 días después de la actividad sexual. Los datos se expresan como proporción entre la densidad óptica de la proteína de interés y la de la β-Actina (β-Act) en unidades arbitrarias (u.a.) (n= 3 ratas por grupo). Debajo de las gráficas se presentan imágenes representativas de las bandas. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; prueba de Tukey.

Tabla 3. Parámetros de los ANOVAs de dos vías parámetros correspondientes a la figura 17

		Met (3 × 0.3 mg/kg)	Condición sexual	Met × condición sexual
NAc shell	D1R	$F_{(1,12)}$ = 1.1; P = 0.32	$F_{(2,12)}$ = 15; P < 0.001	$F_{(2,12)}$ = 11; P = 0.002
	D2R	$F_{(1,12)}$ = 7.1; P = 0.021	$F_{(2,12)}$ = 8; P = 0.006	$F_{(2,12)}$ = 2.5; P = 0.12
	DAT	$F_{(1,12)}$ = 9.2; P = 0.010	$F_{(2,12)}$ = 3.7; P = 0.055	$F_{(2,12)}$ = 8.8; P = 0.004
NAc core	D1R	$F_{(1,12)}$ = 1.8; P = 0.21	$F_{(2,12)}$ = 5.9; P = 0.017	$F_{(2,12)}$ = 1.2; P = 0.33
	D2R	$F_{(1,12)}$ = 2.3; P = 0.16	$F_{(2,12)}$ = 7.1; P = 0.009	$F_{(2,12)}$ = 0.031; P = 0.97
	DAT	$F_{(1,12)}$ = 0.11; P = 0.74	$F_{(2,12)}$ = 7; P = 0.01	$F_{(2,12)}$ = 1.8; P = 0.21
CPu	D1R	$F_{(1,12)}$ = 2.1; P = 0.17	$F_{(2,12)}$ = 6.1; P = 0.015	$F_{(2,12)}$ = 0.31; P = 0.74
	D2R	$F_{(1, 12)}$ = 1.3; P = 0.27	$F_{(2,12)}$ = 2.3; P = 0.14	$F_{(2,12)}$ = 4.9; P = 0.028
	DAT	$F_{(1, 12)}$ = 1.5; P = 0.24	$F_{(2,12)}$ = 2.5; P = 0.12	$F_{(2,12)}$ = 6; P = 0.016

La metanfetamina y la actividad sexual modifican diferencialmente la expresión de los receptores y transportador de DA en diferentes áreas estriatales

Los cambios en la expresión de los receptores a DA y del DAT inducidos por la administración de Met o por la actividad sexual, por sí mismos, se resumen en la tabla 4. Se puede observar que la administración aguda de Met en las ratas C disminuyó la expresión del D2R sólo en el NAc *shell*, mientras que la administración repetida de Met a este grupo incrementó la expresión de DAT en la misma región como único efecto. Por otro lado, la actividad sexual por sí misma produjo cambios en el NAc *core* y el CPu, pero no modificó las proteínas del NAc *shell*. En particular, en animales que tuvieron actividad sexual 2 días antes del sacrificio, tanto en los grupos 1E como S-S, se detectó una disminución en la densidad de DAT en el NAc *core* y en la expresión de los D2R en el CPu. En las ratas S-S también se encontró un aumento en la expresión del D1R en el NAc *core*. Los animales sacrificados 6 días después de haber eyaculado una vez, mostraron un incremento de la expresión del DAT

en el CPu mientras que las ratas S-S presentaron una disminución del DAT en el NAc *core*.

Tabla 4. Cambios en la densidad de D1R, D2R y DAT en diferentes regiones del estriado por la administración de metanfetamina o por la actividad sexual

	Met aguda (3 mg/kg)	Met repetida (3 × 0.3 mg/kg)	Actividad sexual -2 días		Actividad sexual -6 días	
Región estriatal	C	C	1E	S-S	1E	S-S
NAc shell	↓↓D2R	↑↑ DAT	-	-	-	-
NAc core	-	-	↓DAT	↓DAT ↑D1R	-	↓DAT
CPu	-	-	↓D2R	↓D2R	↑DAT	-

C= animales control sin actividad sexual reciente; 1E = animales que eyacularon una vez; S-S = animales que copularon hasta la saciedad; ↓ expresión reducida; ↑ expresión incrementada; Met = metanfetamina; NAc = núcleo accumbens; CPu = caudado-putamen; DAT = transportador de dopamina; D1R = receptor de dopamina D1; D2R = receptor de dopamina D2

La metanfetamina produce cambios en la expresión de los receptores y del transportador de dopamina en diferentes regiones del estriado dependiendo de la condición sexual

Los cambios inducidos por la administración aguda o repetida de Met sobre la expresión de D1R, D2R, y DAT en las diferentes regiones del estriado de ratas macho con diferente condición sexual se resumen en la tabla 5. Se puede observar que la administración aguda de Met incrementó la expresión del D2R en el NAc *shell* de animales que tuvieron actividad sexual, 1E o S-S, pero el efecto fue notoriamente mayor en los S-S. Además, en este último grupo se detectó una disminución en la expresión del D1R en el CPu. En contraste, la administración repetida de Met disminuyó de manera similar la expresión del D1R y de DAT en el NAc *shell* de los animales con 1E y S-S. La administración

repetida de Met también redujo la expresión del D1R en el NAc core y del D2R en el CPu de las ratas S-S.

Tabla 5. Cambios en la densidad de D1R, D2R y DAT en diferentes regiones del estriado por la administración metanfetamina en animales con diferente condición sexual

	Met aguda (3 mg/kg)			Met repetida (3 × 0.3 mg/kg)		
Región estriatal	C	1E	S-S	C	1E	S-S
NAc shell	↓↓D2R	↑D2R	↑↑↑D2R	↑↑ DAT	↓DAT, ↓↓↓D1R	↓DAT, ↓↓↓D1R
NAc core	-	-	-	-	-	↓D1R
CPu	-	-	↓D1R	-	-	↓D2R

C= animales control sin actividad sexual reciente; 1E = animales que eyacularon una vez; S-S = animales que copularon hasta la saciedad; ↓ expresión reducida; ↑ expresión incrementada; Met = metanfetamina; NAc = núcleo accumbens; CPu = caudado-putamen; DAT = transportador de dopamina; D1R = receptor de dopamina D1; D2R = receptor de dopamina D2

6. Discusión

La hipótesis de este trabajo se divide en tres: primero supone que la estimulación del sistema mesolímbico dada por la exposición a Met modificaría el desarrollo y establecimiento de la saciedad sexual, que la estimulación del sistema mesolímbico dada la cópula hasta la saciedad alteraría los efectos motores y recompensantes de la Met y, finalmente que los efectos conductuales estarían acompañados de modificaciones en la densidad de los receptores dopaminérgicos y la expresión del DAT en las distintas regiones del estriado.

De acuerdo con la hipótesis, nuestros resultados mostraron que:

1) La Met alargó el desarrollo de la saciedad sexual y aumentó el número de montas e intromisiones que las ratas macho despliegan durante las primeras series copulatorias, mas no impidió que todos los animales quedaran sexualmente saciados.

2) Los dos tipos de actividad sexual exacerbaron la hiperlocomoción que producen dosis intermedias y altas de Met, facilitaron el desarrollo de la sensibilización locomotora y prolongaron su expresión a largo plazo. Sin embargo, la estimulación sexual intensa no modificó de manera generalizada los efectos motores de la Met.

3) La condición sexual alteró el valor recompensante de la Met, para aquellos animales que tuvieron una actividad sexual intensa dada por la cópula hasta la saciedad.

4) Tanto la cópula hasta la saciedad como la Met modificaron por sí solas la expresión de los receptores a DA y del DAT en el estriado; la primera indujo adaptaciones específicamente en el NAc *core* y el CPu, mientras que la segunda produjo modificaciones únicamente en el NAc *shell*.

5) Cuando la Met se administró a los grupos de 1E y S-S, se produjeron cambios en el NAc *shell* opuestos a los que se presentaron en los animales

que no tuvieron previamente actividad sexual. Además, en los animales que sí copularon, la expresión de los D1R se redujo en esa misma región. Por otro lado, los animales sexualmente saciados tratados con Met presentaron cambios adicionales en los receptores dopaminérgicos del NAc core y en el CPu.

6.1 El efecto de la metanfetamina sobre el desarrollo de la saciedad sexual

Se ha descrito que hay dos componentes que regulan la expresión de la conducta sexual, el componente motivacional y el componente motor (Hull *et al.*, 2002). Cuando un fármaco altera el componente motivacional, se modifican las **latencias** de monta e intromisión y el intervalo post-eyaculatorio; mientras que fármacos que alteran el componente motor (también denominado de ejecución o consumatorio) modifican el **número** de montas e intromisiones y la latencia de eyaculación. Durante la cópula hasta la saciedad se ha observado consistentemente que los parámetros motores de la cópula se van reduciendo conforme se presentan las series copulatorias sucesivas (Beach & Jordan, 1956; Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1994; Rodríguez-Manzo *et al.*, 2011). Los animales que en nuestro trabajo recibieron el vehículo mostraron esa reducción en los parámetros motores. Esto se ha interpretado como la facilitación en la ejecución de la cópula conforme la saciedad sexual se va desarrollando (Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1994) y era el resultado esperado.

La Met en cambio, afectó los parámetros motores durante el desarrollo de la saciedad sexual y retrasó el tiempo en el que las ratas quedaron saciadas. Particularmente la dosis más alta de Met impidió que el número de montas e intromisiones y la latencia de eyaculación se redujeran en las primeras tres series copulatorias. Estas alteraciones y la ausencia de efectos en la última serie del desarrollo de la saciedad sexual son consistentes con los parámetros farmacocinéticos de la Met, cuyos efectos inician rápidamente (5 min) y su vida

media es de 1 h (Melega *et al.*, 1995; Gentry *et al.*, 2004). Además, el aumento en el número de montas e intromisiones y en la latencia de eyaculación inducidos por la Met pudo haber contribuido al retraso para lograr la saciedad sexual. Sin embargo, la Met no afectó el número de animales que se saciaron sexualmente, ni la capacidad eyaculatoria de los animales.

En este trabajo observamos que la Met no alteró los parámetros asociados al componente motivacional de la cópula, sin embargo en un reporte previo se describe que la Met (2 y 4 mg/kg) afecta principalmente el componente motivacional (Frohmader *et al.*, 2010). Es posible que las discrepancias entre nuestros resultados y los de dicho trabajo se deban a diferencias metodológicas, tales como la latencia del fármaco, (0 min *versus* 30 min) el criterio de inclusión de los animales y la duración de la prueba.

A las 24 h post-saciedad, algunos de los animales pre-tratados con Met, independientemente de la dosis, no se encontraron sexualmente inhibidos porque desplegaron dos o tres series eyaculatorias; sin embargo, esta proporción de animales no fue diferente a la del grupo tratado con vehículo. En conclusión, la Met, un agonista indirecto de la transmisión dopaminérgica impidió que el desarrollo de la saciedad sexual se facilitara conforme transcurrieron las series copulatorias sucesivas, al afectar específicamente la ejecución de la cópula. Adicionalmente, la Met retrasó, pero no impidió, el establecimiento de la saciedad sexual y tampoco afectó la inhibición sexual típica que presentan estos animales a las 24 h. Recientemente se reportó que el pre-tratamiento con un antagonista no selectivo de los receptores dopaminérgicos (haloperidol) específicamente durante el desarrollo de la saciedad sexual no impide el establecimiento de este fenómeno, ni la aparición de la inhibición sexual a las 24 h post-saciedad (González-Morales & Rodríguez-Manzo, 2020). En cambio, de 24 a 72 h después de la cópula repetida, modificar la transmisión dopaminérgica (directa o indirectamente) tiene un alto impacto a nivel conductual porque revierte la inhibición sexual de las ratas saciadas (Guadarrama-Bazante & Rodríguez-Manzo, 2019;

Canseco-Alba *et al.*, 2022). *Con base en nuestros resultados y en esta evidencia, es posible sugerir que alterar la transmisión dopaminérgica, aumentándola o bloqueándola, durante las series copulatorias sucesivas no modifica la forma en que se desarrolla o se establece la saciedad sexual.*

Las principales alteraciones en los parámetros motores de las primeras series copulatorias (aumento en el número montas e intromisiones y en la latencia de eyaculación) se presentan con la dosis de 2 mg/kg de Met. Como se observó en la prueba de actividad motora, 2 mg/kg de Met produjeron el máximo efecto de locomoción en todos los grupos. Además, en una prueba piloto en la cual administramos una dosis mayor de Met (4 mg/kg) observamos que los movimientos estereotipados aumentaban tanto que limitaban la capacidad copulatoria de los animales, razón por la que el experimento se suspendió. Es posible que las alteraciones que la Met indujo sobre el desarrollo de la cópula estén influenciadas por un efecto motor inespecífico que paralelamente se presenta, y no sobre la expresión de la conducta sexual masculina.

Se ha reportado que la magnitud con que la Met incrementa la liberación de DA es dependiente de la dosis (Bhimani *et al.*, 2021). En el rango de dosis que nosotros utilizamos, el incremento de DA en el NAc inducido por Met va de 200%, con la dosis más baja, al 600% con la dosis más alta (Adachi *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2018). Nuestros resultados indican que la hiperdopaminergia inducida por dosis bajas (0.5 y 1 mg/kg) de Met prácticamente no interfiere con el desarrollo de la saciedad sexual, mientras que una hiperdopaminergia más elevada altera los sistemas dopaminérgicos encargados de regular el componente de ejecución de la cópula. De acuerdo con los reportes mencionados previamente, dosis similares a las que usamos en este trabajo (0.32, 1 y 2 mg/kg) elevan la liberación de DA entre 50 - 120 min después de su administración (Adachi *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2018), mientras que la cópula hasta la saciedad lo hace hasta por 60 min (Canseco-Alba *et al.*, 2022). Hasta donde tenemos conocimiento, no se ha determinado cómo se modifican los niveles de DA cuando este tipo

de estímulos se presentan al mismo tiempo, sin embargo con base en estas evidencias es posible pensar, que la estimulación en la liberación de DA inducida por cada estímulo ocurre en la misma ventana temporal y que esto puede provocar que la ejecución de la cópula se deteriore.

6.2 El impacto de la condición sexual sobre los efectos conductuales de la metanfetamina

En esta serie de experimentos, la actividad sexual precedió por 24 h a los tratamientos con Met, es decir que los efectos de la Met se experimentan cuando los tres grupos de ratas macho poseían diferente condición sexual, desde haber copulado hasta la saciedad sexual, hasta una eyaculación o no tener actividad sexual previa.

6.2.1 Efectos motores de la metanfetamina

Encontramos que la actividad sexual previa interfirió con algunos de los efectos motores de la Met. Aquellos grupos que tuvieron actividad sexual 24 h antes fueron los que expresaron una respuesta de locomoción exacerbada. Y entre estos grupos, los animales que tuvieron la actividad sexual intensa (S-S) fueron los más vulnerable a expresar una cantidad de locomoción mayor y por más tiempo ante la dosis de 3 mg/kg de Met. Con la dosis más alta de Met (4 mg/kg) los animales S-S se mostraron más sensibles al efecto de hiperlocomoción por algunos minutos de la primera mitad de la prueba. Dichas diferencias se desvanecieron cuando la locomoción empezó a decaer a costa de una mayor expresión de estereotipias. Las dosis de 3 y 4 mg/kg son consideradas de moderadas a altas en pruebas de locomoción (Gentry *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2012) y dosis mayores (3 – 7 mg/kg) se ha descrito que inducen la expresión intensa de movimientos estereotipados (Balsara *et al.*, 1979; Ito *et al.*, 1997; Milesi-Halle' *et al.*, 2007). En línea con estos datos, las dosis altas de Met que nosotros probamos indujeron la aparición de movimientos estereotipados. Sin embargo, en contraste con las amplias

diferencias que observamos en la hiperlocomoción, la cantidad de movimientos estereotipados no varió en función de la actividad sexual. *Con base en estos resultados se puede concluir que la actividad sexual reciente sensibiliza preferentemente la respuesta locomotora inducida por Met, si las dosis son intermedias o altas (2 - 4 mg/kg).*

De manera interesante, se han relacionado regiones específicas del estriado con la regulación de los movimientos locomotores y estereotipados inducidos por las anfetaminas. Por ejemplo, microinyecciones de D-anfetamina o de agonistas directos de los receptores a DA dentro del NAc incrementan la actividad locomotora en mayor magnitud que cuando se administra en el CPu. De manera opuesta, la administración de dichos fármacos en el CPu induce la aparición de estereotipias, que no se observan con su administración en ambas regiones del accumbens (Costall *et al.*, 1977; Staton & Solomon, 1984). Con base en estas evidencias, se ha sugerido que el efecto de hiperlocomoción de las anfetaminas está relacionado con la activación del sistema mesolímbico dopaminérgico, mientras que los movimientos estereotipados están relacionados con la activación del sistema nigroestriatal (Ares-Santos *et al.*, 2013). Dado que la actividad sexual reciente afectó la hiperlocomoción inducida por Met, y no las estereotipias, toma relevancia el análisis de la expresión de los receptores y del DAT en las diversas regiones estriatales que discutiremos más adelante.

6.2.2 Efectos en la sensibilización locomotora inducida por la metanfetamina

En este trabajo encontramos que los animales más vulnerables a los efectos locomotores inducidos por administraciones repetidas de la Met fueron aquellos que copularon un día antes de iniciar el tratamiento. Así, los dos grupos que tuvieron actividad sexual, (1E y S-S) desarrollaron la sensibilización locomotora con menos administraciones (a partir de la 4ª administración), y se mantuvieron sensibilizados después de un plazo largo (2

semanas después de terminar el pre-tratamiento). La única diferencia entre los grupos que sí copularon fue que las ratas S-S siguieron progresando en el desarrollo de la sensibilización después de la cuarta administración de Met, mientras que la respuesta locomotora se estancó entre la cuarta y la décima administración de Met en las ratas 1E. En contraste, los animales que no copularon antes de iniciar la prueba se mostraron resistentes a desarrollar una respuesta locomotora sensibilizada al requerir hasta diez administraciones de Met y a expresar la sensibilización a largo plazo pues después de dos semanas el efecto se desvaneció. *En conclusión, la actividad sexual favorece la expresión de la sensibilización locomotora a largo plazo.*

Estos resultados son consistentes con los efectos agudos que se describieron previamente al observar que los animales que copularon un día antes de recibir una dosis de Met se mostraron más sensibles a la hiperlocomoción, y con estudios que muestran que la anfetamina produce una mayor respuesta locomotora en animales sexualmente experimentados en comparación con la que produce en animales sexualmente *naïve* (Bradley & Meisel, 2001; Pitchers *et al.*, 2010).

Estudios previos, muestran que las ratas sexualmente saciadas son hipersensibles a los efectos de un agonista serotoninérgico durante un periodo de 72 h, después de este plazo la hipersensibilidad empieza a desvanecerse (Rodríguez-Manzo *et al.*, 2011). Nuestros datos indican que las ratas sexualmente saciadas también son hipersensibles a un agonista dopaminérgico indirecto, y que la hipersensibilidad que produce este fármaco se desarrolla hasta por 5 días si el fármaco se administra de manera repetida. En este trabajo no se determinó el número de administraciones necesarias para llegar a una meseta en el desarrollo de la sensibilización de ratas sexualmente saciadas, ni se analizó la expresión de las proteínas dopaminérgicas. Estos análisis pueden ser interesantes para evaluar las posibles neuroadaptaciones subyacentes durante la fase de desarrollo de la sensibilización.

Existen evidencias que sugieren que modificar la transmisión dopaminérgica y glutamatérgica en el ATV durante la administración repetida de anfetamina facilita o previene el desarrollo de la sensibilización (Xue *et al.*, 1996; Del Arco *et al.*, 1999; Vanderschuren & Kalivas, 2000); y en particular, manipular el receptor glutamatérgico tipo NMDA (NMDAR) pueden afectar los cambios en el sistema mesolímbico que acompañan al desarrollo de la sensibilización (Wolf *et al.*, 1994). Recientemente se reportó que la densidad y composición de los NMDAR cambia en el ATV de las ratas sexualmente saciadas (Rodríguez-Manzo *et al.*, 2021). Los autores sugieren que los cambios que se producen en este receptor pueden conducir a un aumento de la afinidad por el glutamato y al incremento del influjo de Ca^{2+} en las neuronas dopaminérgicas del ATV de las ratas S-S. Si bien en este trabajo no evaluamos a los receptores glutamatérgicos, es probable que por las similitudes metodológicas para inducir la saciedad sexual, los animales S-S de este experimento también expresen los cambios en la densidad y composición de los receptores NMDA en el ATV y, por lo tanto, produzcan una facilitación en la excitabilidad del sistema mesolímbico. En conjunto, estas evidencias nos permiten sugerir que la facilitación en el desarrollo de la sensibilización locomotora que observamos en las ratas saciadas puede relacionarse con adaptaciones en el NMDAR que facilitan la excitabilidad de las neuronas dopaminérgicas del sistema mesolímbico.

Varios mecanismos están asociados con la expresión a largo plazo de la sensibilidad locomotora a anfetaminas; por ejemplo, una hipersensibilidad en las sistemas dopaminérgico mesolímbico y nigroestriatal, un aumento de la sensibilidad de los D1R en el NAc, un aumento de la fosforilación del DAT en el estriado y una reducción de los receptores glutamatérgicos de tipo AMPA (AMPAR) en el NAc (Iwata *et al.*, 1997; Lu & Wolf, 1999; Vanderschuren & Kalivas, 2000). Dado que estos procesos ocurren en el sistema mesolímbico, es probable que algunos de ellos se presenten en los animales que se siguieron mostrando sensibles a la Met después de dos semanas de terminar

el pre-tratamiento. Se requieren estudios posteriores para confirmar la presencia de estas adaptaciones en las ratas sexualmente saciadas.

6.2.3 Efectos en la preferencia del lugar condicionada a metanfetamina

En este trabajo encontramos que la condición sexual alteró el efecto recompensante de la Met. Los animales que previamente copularon hasta la saciedad o que no tuvieron actividad sexual expresaron un efecto recompensante generalizado con todas las dosis, mientras que los animales que copularon hasta lograr una eyaculación sólo percibieron como recompensante a la dosis intermedia de Met (0.3 mg/kg). En protocolos similares al nuestro, la dosis de 0.3 mg/kg de Met es sub-efectiva para producir un efecto recompensante (Schindler *et al.*, 2002; Gehrke *et al.*, 2003; Khanegheini *et al.*, 2021). Únicamente cuando se utiliza un procedimiento extenso, de ocho o más sesiones de condicionamiento, las dosis sub-efectivas de Met (0.1 - 0.5 mg/kg) logran percibirse como recompensante (Gehrke *et al.*, 2006; Zakharova *et al.*, 2009; Hofford *et al.*, 2014). Con base en lo anterior, podemos pensar que en nuestro experimento, todos los animales expresaron cierta sensibilización al efecto recompensante de la Met dado que expresaron una PLC con dosis sub-efectivas de Met y seis sesiones de condicionamiento.

La hipersensibilidad al efecto recompensante de la Met que aquí observamos coincide con lo que se observa en animales sexualmente experimentados. Pitchers y colaboradores (2010) reportan que la experiencia sexual sensibiliza la PLC inducida con anfetamina, sólo después de un periodo de abstinencia sexual de 10 días. Los autores sugieren que esta sensibilización se asocia a cambios morfológicos en el NAc inducidos por la estimulación sexual. Estas evidencias pueden explicar por un lado, que en nuestro experimento la sensibilización al efecto recompensante de la Met se debe a que todos los grupos tenían un sistema mesolímbico remodelado al haber adquirido experiencia sexual semanas antes de iniciar el experimento; y por otro lado, puede explicar por qué el grupo C se mostró sensible a todas las dosis de Met,

ya que los animales pasaron por un periodo de inactividad sexual (6-7 días) entre el inicio del condicionamiento y la última sesión copulatoria del periodo de entrenamiento.

Las ratas que eyacularon repetidamente (S-S) antes del condicionamiento percibieron que todas las dosis probadas de Met fueron recompensantes; mientras que para el grupo que eyaculó sólo una vez, las dosis más alta y baja de Met carecieron de efecto. Estas diferencias no se pueden relacionar con un periodo de inactividad sexual, pero pueden estar asociadas con cambios en el funcionamiento del sistema mesolímbico inducidos por la cantidad de estimulación sexual reciente. Por ejemplo, 24 h después de la S-S estos animales expresan un tono hipodopaminérgico en el NAc, que no se presenta en aquellos animales que copulan hasta 1E (Canseco-Alba *et al.*, 2022). Dado que nosotros inducimos la saciedad sexual de la misma manera que en el trabajo que se mencionó, es probable que los animales S-S, a diferencia de los otros grupos, tengan un tono dopaminérgico reducido precisamente al iniciar el condicionamiento con la Met. Diversos autores han hipotetizado que entre mayor diferencia hay entre el estado dopaminérgico basal y el que produce una drogas de abuso, es más fácil percibir el efecto hedónico o recompensante de la sustancia (Koob & Le Moal, 2001; George *et al.*, 2012). Por ejemplo, en un modelo de hipodopaminergia en el NAc que está asociado al alto consumo espontáneo de etanol, se reportan resultados que coinciden con los nuestros ya que estos animales son hipersensibles al efecto recompensante de la cocaína y también a la hiperlocomoción que producen las anfetaminas (Stromberg & Mackler, 2005; Mathews *et al.*, 2009; Ericson *et al.*, 2019). Adicionalmente, utilizando otros protocolos, se ha relacionado que los animales con un estado hipodopaminérgico producido por factores naturales o artificiales son más sensibles a los efectos adictivos de varias drogas de abuso (Di Chiara & Imperato, 1988a; Karkhanis *et al.*, 2019; Samaha *et al.*, 2021; Sanna *et al.*, 2021). Con base en estas evidencias *es probable que la hipersensibilidad que las ratas S-S mostraron a los efectos recompensantes de la Met se asocie con el tono hipodopaminérgico en el NAc.*

6.3 Expresión de los receptores a DA y del DAT en el estriado después de la metanfetamina o de la actividad sexual

Se ha descrito que los efectos conductuales de las anfetaminas son procesos modulados en las diferentes subregiones del accumbens; el NAc *shell* contribuye a los efectos recompensantes de estas drogas y el NAc *core* participa en la hiperlocomoción (Carr *et al.*, 1988; Boye *et al.*, 2001; Sellings & Clarke, 2003). Además, el núcleo CPu regula los efectos motores inducidos por anfetaminas y es activado por la conducta sexual (Pfaus *et al.*, 1990; Damsma *et al.*, 1992). Por lo tanto, en este estudio consideramos relevante analizar cambios en los receptores a DA y en el DAT en las diferentes regiones del estriado producidos por la actividad sexual, o por la Met, y cuando los animales experimentaron ambos estímulos.

6.3.1 Efectos de los tratamientos con metanfetamina

Los dos tratamientos con Met en animales que no copularon previamente a la administración del fármaco (grupo C) modificaron la expresión de las proteínas en el NAc *shell*. Es decir, el tratamiento agudo redujo la expresión de los D2R en el NAc *shell*; mientras que la administración repetida del fármaco incrementó los niveles de DAT en esa misma región. Pocos trabajos han relacionado cambios en la expresión de proteínas con dosis bajas de Met como las que usamos en este estudio. Por ejemplo, Chauhan y colaboradores (2014) encontraron un decremento similar al que encontramos en la expresión del D2R con una administración aguda de Met, pero con el doble de la dosis y en sinaptosomas del CPu; mientras que Broom y Yamamoto (2005) reportan un aumento de la densidad del DAT en el NAc similar al que aquí reportamos, con la diferencia de que ellos lo observan con una dosis más alta y con mayor número de administraciones (0.3 mg/kg, por 3 días *versus* 2 mg/kg al día, por 10 días). Estas evidencias y *nuestros resultados apoyan la idea de que la Met, incluso de manera aguda, es capaz de modificar los niveles del D2R y del DAT en el estriado.*

Como se mencionó brevemente, el grupo C posee un sistema mesolímbico remodelado por la adquisición de experiencia sexual. Entre los cambios que la actividad sexual genera en el NAc de roedores hembras y machos hay un aumento en el número de espinas dendríticas (Pitchers *et al.*, 2010; Staffend *et al.*, 2014), una sensibilización de la liberación de DA ante la estimulación sexual (Kohlert & Meisel, 1999) y una facilitación de la acumulación de AMPc y de los factores de transcripción c-Fos y ΔFosB involucrados en la activación neuronal (Bradley & Meisel, 2001; Bradley *et al.*, 2004; Pitchers *et al.*, 2010). Este tipo de cambios pudieron volver a los animales C más reactivos a que la Met modificara la densidad de los D2R y del DAT. Sería importante hacer la comparación sobre los cambios moleculares inducidos por la Met entre animales con y sin experiencia sexual para comprobar dicha hipótesis.

6.3.2 Efectos de la actividad sexual

En contraste con los efectos de la Met, los cambios en la expresión de los receptores dopaminérgicos y del DAT inducidos por la actividad sexual se confinaron a la región *core* del NAc y al CPu. Esto se observó dos días después de la actividad sexual (1E o S-S), donde disminuyó la densidad del DAT en el NAc *core* y del D2R en el CPu en ambos grupos, e incrementó la expresión de los D1R en el NAc *core* en los animales S-S. Hasta donde tenemos conocimiento, *este es el primer estudio que correlaciona cambios en la expresión de los receptores dopaminérgicos y del DAT estriatales con la estimulación sexual reciente en ratas macho sexualmente experimentadas, por lo que podemos hipotetizar que la regulación a la baja del DAT en el NAc core y del D2R en el CPu resulta del despliegue reciente de la conducta sexual, independientemente de su intensidad; mientras que la regulación a la alta de los D1R en el NAc core resulta de una estimulación sexual intensa dada por la cópula hasta la saciedad.*

La presencia de cambios en el NAc core y en el CPu asociados a la actividad sexual van en línea con el papel que tienen ambas regiones en la modulación

de conductas motivadas por estímulos naturales como la cópula o los alimentos apetitosos (Pfaus *et al.*, 1990; Damsma *et al.*, 1992; Corbit *et al.*, 2001; Palmiter, 2008; Berridge & Kringelbach, 2015; Dai *et al.*, 2022). El incremento en la densidad de los D1R selectivamente en el NAc *core* de las ratas S-S es similar a lo que reportan Staffend y colaboradores (2014) en hámsteres hembras, en donde la actividad sexual aumenta la densidad de espinas dendríticas que expresan específicamente D1R en las NEM de la región *core* del NAc. No obstante, a diferencia de ese trabajo, nosotros observamos que la actividad sexual también modifica la expresión del D2R en el CPu y del DAT en el NAc *core*. Las discrepancias pueden explicarse por la forma en que se estimula la actividad sexual, la especie y el sexo de los animales.

Se han reportado cambios moleculares en varios sistemas de neurotransmisión en el sistema mesolímbico de las ratas sexualmente saciadas. Por ejemplo, en el ATV de las ratas S-S se observa la internalización del receptor opioidérgico μ y del receptor endocannabinoide CB1, así como cambios en la composición de los receptores glutamatérgicos (Garduño-Gutiérrez *et al.*, 2013b; Rodríguez-Manzo *et al.*, 2021); mientras que en el NAc se observan alteraciones en el tono y liberación de DA (Canseco-Alba *et al.*, 2022). Así, el incremento de los D1R en el NAc *core* que nosotros observamos en las ratas S-S se suma a los cambios que previamente se han reportado y en conjunto sugieren que la cópula hasta la saciedad es un estímulo suficiente para desencadenar neuroadaptaciones en el sistema mesolímbico dopaminérgico y en los sistemas de neurotransmisión que lo modulan.

En este trabajo observamos que la mayoría de las adaptaciones resultado de la actividad sexual reciente fueron transitorias, porque casi todas desaparecieron después de seis días de haber copulado, y sólo persistió el decremento del DAT en el NAc core de las ratas S-S. Es posible que la liberación prolongada de DA, dada por la cópula intensa, pueda demandar una mayor recaptación del neurotransmisor que realiza el transportador e impactar

a largo plazo en su densidad. Hasta este momento, no tenemos una explicación al incremento en la expresión del DAT en el CPu observado 6 días después de que los animales tuvieran 1E. Este hallazgo requiere mayor investigación en el futuro.

Finalmente, con el análisis de los cambios en los receptores dopaminérgicos y en el DAT inducidos por la Met o la actividad sexual podemos concluir que bajo nuestras condiciones observamos una disociación de las regiones estriatales que cada uno afecta. Estos resultados pueden reflejar que estímulos recompensantes que tienen en común aumentar la liberación de DA en el estriado, al ser de diferente naturaleza, reclutan preferentemente neuronas de subregiones particulares. Recientemente se ha empezado a analizar si existe una selectividad en los sistemas o circuitos que procesan el componente adictivo de las drogas de abuso y de las recompensas naturales (Nall *et al.*, 2021), sin embargo, estos análisis todavía no son concluyentes y por ahora ninguno se ha enfocado a hacer esa comparación con la conducta sexual.

6.3.3 Interacción entre la actividad sexual y las adaptaciones inducidas por Met

En este trabajo encontramos que los efectos de los tratamientos con Met se modificaron si los animales copulan un día antes de recibir el fármaco. Así, contrario a lo que la Met produjo en el NAc *shell*, cuando la actividad sexual le precedió, la expresión de los D2R, en vez de disminuir, aumentó con la administración aguda (3 mg/kg); y la expresión de DAT, en vez de aumentar, disminuyó con el tratamiento repetido (0.3 mg/kg). Estos resultados muestran, por primera vez, que la estimulación sexual es suficiente para invertir los cambios en la expresión del D2R y del DAT en el NAc shell inducidos por la Met.

Adicionalmente, ambos tratamientos indujeron nuevas modificaciones en el NAc *shell* y *core* y en el CPu, particularmente en las ratas S-S. No podemos

discernir si la estimulación sexual intensa y/o el tono hipodopaminérgico de las ratas S-S favorece que la Met induzca neuroadaptaciones adicionales en el estriado, pero podemos sugerir que esta condición sexual favorece que todo el estriado se vuelva reactivo a los efectos moleculares de los psicoestimulantes. *En conclusión, un estímulo natural como es la conducta sexual puede modificar los efectos moleculares de una droga de abuso; y la intensidad de dicha estimulación es relevante porque a mayor estimulación sexual, más se extienden las afectaciones inducidas por la Met en el estriado*.

En conjunto, estos resultados aportan evidencias adicionales a los antecedentes que existen sobre la capacidad de los psicoestimulantes para producir adaptaciones en el estriado (Sun *et al.*, 2003; German *et al.*, 2012; Ashok *et al.*, 2017) y amplían las evidencias de que, aun a dosis bajas y con tratamientos sub-crónicos, la Met pueden generar adaptaciones si el sistema mesolímbico de los sujetos está sensibilizado. Estos resultados también van en línea con los antecedentes que sugieren que los cambios plásticos inducidos por estímulos naturales pueden ser distintos a los que se producen por recompensas artificiales (Berridge & Kringelbach, 2015; Nall *et al.*, 2021). Sin embargo, si el estriado se activa intensamente por un estímulo natural, éste se muestra más reactivo a un psicoestimulante pese a que ambos estímulos no coincidan temporalmente.

7. Resumen de resultados

Los hallazgos de esta investigación se resumen a continuación:

- La Met interfiere con el desarrollo de la saciedad sexual al limitar el efecto facilitador en la ejecución de series copulatorias sucesivas y retrasar el establecimiento de la saciedad sexual, pero no impide que el fenómeno se establezca, ni altera la expresión de la inhibición sexual que lo caracteriza.
- La actividad sexual no modifica de manera generalizada los efectos locomotores y recompensantes de la Met; la actividad sexual intensa dada por la cópula hasta la saciedad amplifica ambos efectos mientras que la ejecución de 1E sólo aumenta las acciones motoras de esta droga de abuso.
- La sola estimulación con Met o por la actividad sexual cambia la densidad de los D1R, D2R y del DAT, y estas adaptaciones se presentan en distintas regiones del estriado, según la naturaleza del estímulo. La Met, aguda o repetida, modifica la densidad de los D2R y del DAT en el NAc *shell* (Fig.18a), mientras que la actividad sexual, independientemente de su intensidad, altera la expresión de los receptores a DA y del DAT en el NAc *core* y en el CPu (Fig.18b).
- La actividad sexual induce neuroadaptaciones opuestas a las producidas por la Met. Esta última modifica a los D2R y al DAT en el NAc *shell*, mientras que la en los animales sexualmente saciados la Met induce neuroadaptaciones en los D1R del NAc *core* y del CPu (Fig.18c).

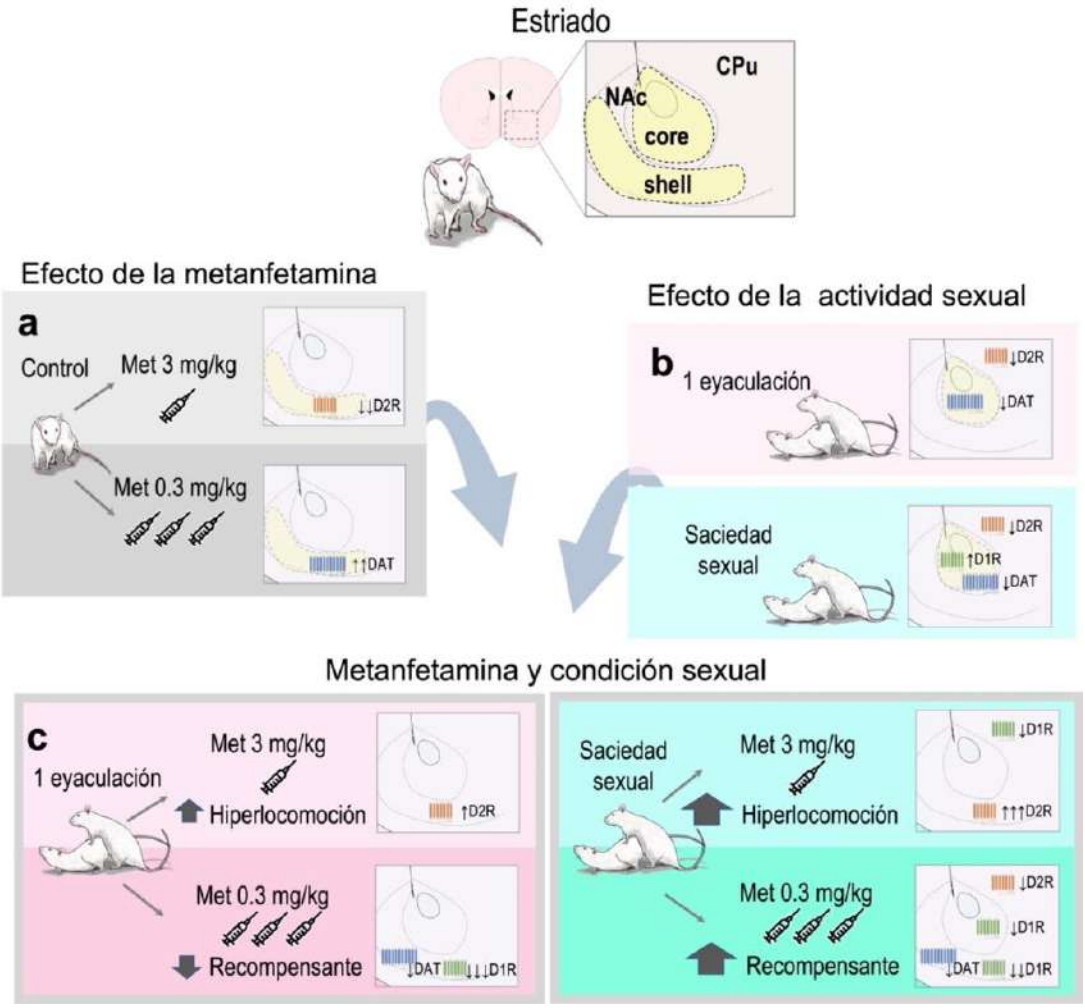

Figura 18. Relación de cambios moleculares producidos por la condición sexual y el esquema de tratamiento con metanfetamina. (**a**) Después de la administración aguda o repetida de metanfetamina (Met) se observaron cambios en la expresión del receptor a dopamina tipo D2 (D2R) y del transportador de dopamina (DAT) en la región shell del núcleo accumbens (NAc). (**b**) Después de la actividad sexual hasta una eyaculación o hasta la saciedad sexual los cambios en la expresión de los receptores a dopamina y del transportador se limitaron al NAc core y al núcleo caudado-putamen (CPu). (**c**) Cuando los animales primero experimentaron la actividad sexual y 24 h después las administraciones de Met, los cambios en la densidad de los receptores a dopamina y del transportador se extendieron a todas las subregiones del estriado y a nivel conductual, los animales que copularon hasta la saciedad sexual se mostraron más sensibles a los efectos locomotores y recompensantes de la Met.

8. Conclusiones

Los resultados obtenidos nos permiten confirmar la hipótesis planteada, ya que la Met modificó el desarrollo y el establecimiento de la saciedad sexual, la cópula hasta la saciedad sexual aumentó los efectos motores y recompensantes de la Met y se detectaron modificaciones en la densidad de los receptores dopaminérgicos y en la expresión del DAT en las distintas regiones del estriado involucradas en la modulación de estas conductas.

En conclusión este trabajo demuestra es que una conducta motivada de tipo natural, como es la actividad sexual, modifica los efectos de un psicoestimulante tanto a nivel conductual como a nivel molecular, lo que evidencia la existencia de un fenómeno de sensibilización cruzada entre estímulos recompensantes de diferente naturaleza.

9. Perspectivas

A partir de los resultados obtenidos se plantean las siguientes perspectivas:

- Determinar las concentraciones de DA en las distintas regiones del estriado a través de técnicas con una alta resolución temporal, principalmente en dos momentos, 1) mientras concurren la cópula hasta la saciedad y la administración de anfetaminas para determinar si los incrementos en la concentraciones de DA se presentan en las mismas regiones y si son respuestas que se suman, potencian o no interaccionan; y 2) cuando se administra Met a las 24 h post-saciedad sexual para analizar la magnitud del incremento de DA inducido por la droga en animales con un tono hipodopaminérgico.
- Estudiar si en un modelo animal de hipodopaminergia estriatal reversible, quimiogenéticamente u optogenéticamente inducido, se modifica el componente motivacional de una conducta recompensante como es la conducta sexual, y en particular si bajo estas condiciones cambia la forma en que se desarrolla la saciedad sexual y se expresa la inhibición sexual a las 24 h.
- Profundizar sobre la respuesta de las neuronas dopaminérgicas de los sistemas mesolímbico o nigroestriatal al evaluar sus disparos y la cantidad de neurotransmisor liberado a lo largo de la prueba de sensibilización locomotora, mediante registros electrofisiológicos y voltametría cíclica de escaneo rápido en animales en libre movimiento, esto para correlacionar si la respuesta locomotora exacerbada es dependiente de una respuesta neuronal sensibilizada.
- Evaluar a los receptores glutamatérgicos (receptores AMPA y NMDA) del estriado debido a que hay evidencias que indican la participación de estas proteínas en el desarrollo y expresión de la sensibilización locomotora. En el mismo sentido, la corteza prefrontal y el ATV participan en la sensibilización locomotora por lo que sería interesante estudiar cambios en las proteínas dopaminérgica y glutamatérgicas de

los animales que cursan por la actividad sexual y la sensibilización locomotora.

- Analizar si las ratas sexualmente saciadas se siguen mostrando hipersensibles a un protocolo extendido de la PLC (extinción y reinstauración), esto sugeriría que la saciedad sexual se relaciona con una vulnerabilidad a los procesos de la adicción como la abstinencia o la recaída. También sería relevante probar si drogas de abuso opioides y cannabinoides en la prueba de PLC debido a que esos sistemas de neurotransmisión sufren adaptaciones después de la saciedad sexual.
- Estudiar si la interacción entre la saciedad sexual y la administración de Met es más evidente con administración de Met intra-NAc que de manera sistémica.
- Identificar los mecanismos moleculares que controlan el incremento o disminución de la expresión del DAT con distintos estímulos recompensantes y si se presentan cambios paralelos en su funcionamiento.
- Evaluar si los receptores dopaminérgicos de las ratas tratadas con distintos tipos de estímulos recompensantes expresan de manera inicial cambios en su funcionamiento que los hagan más sensibles, por ejemplo, al estudiar la unión de sus ligandos y la actividad de la adenilato ciclasa.
- Corroborar la naturaleza de las neuronas espinosas medias donde se producen los cambios en la expresión de los receptores dopaminérgicos y hacia qué regiones dirigen sus aferencias.
- Caracterizar los cambios moleculares inducidos por los estímulos del sistema dopaminérgico en las distintas áreas cerebrales involucradas en la regulación.

Referencias

Adachi, Y.U., Watanabe, K., Satoh, T., & Vizi, E.S. (2001) Halothane potentiates the effect of methamphetamine and nomifensine on extracellular dopamine levels in rat striatum: A microdialysis study. *Br. J. Anaesth.*, **86**, 837–845.

Aguilar-Moreno, A., Ortiz, J., Concha, L., Alcauter, S., & Paredes, R.G. (2022) Brain circuits activated by female sexual behavior evaluated by manganese enhanced magnetic resonance imaging. *PLoS One*, **17**, 1–24.

Almanza, A., Segura-Chama, P., León-Olea, M., Luis, E., Garduño-Gutiérrez, R., Mercado-Reyes, J., Simón-Arceo, K., Coffeen, U., Hernández-Cruz, A., Pellicer, F., & Mercado, F. (2019) Cellular Mechanism for Specific Mechanical Antinociception by D2-like Receptor at the Spinal Cord Level. *Neuroscience*, **417**, 81–94.

Amalric, M. & Koob, G.F. (1993) Functionally selective neurochemical afferents and efferents of the mesocorticolimbic and nigrostriatal dopamine system. *Prog. Brain Res.*, **99**, 209–226.

Ares-Santos, S., Granado, N., & Moratalla, R. (2013) Neurobiology of Methamphetamine. In *Biological Research on Addiction*. pp. 579–591.

Ashok, A.H., Mizuno, Y., Volkow, N.D., & Howes, O.D. (2017) Association of stimulant use with dopaminergic alterations in users of cocaine, amphetamine, or methamphetamine a systematic review and meta-analysis. *JAMA Psychiatry*, **74**, 511–519.

Badiani, A., Caprioli, D., & De Pirro, S. (2019) Opposite environmental gating of the experienced utility ('liking') and decision utility ('wanting') of heroin versus cocaine in animals and humans: implications for computational neuroscience. *Psychopharmacology (Berl).*, **236**, 2451–2471.

Balfour, M.E., Brown, J.L., Yu, L., & Coolen, L.M. (2006) Potential contributions of efferents from medial prefrontal cortex to neural activation following sexual behavior in the male rat. *Neuroscience*, **137**, 1259–1276.

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

Balsara, J.J., Jadhav, J.H., Muley, M.P., & Chandorkar, A.G. (1979) Effect of drugs influencing central serotonergic mechanisms on methamphetamine-induced stereotyped behavior in the rat. *Psychopharmacol.*, **64**, 303–307.

Bardo, M.T. (2013) The Mesolimbic Dopamine Reward System and Drug Addiction. In Miller, P.M. (ed), *Biological Research on Addiction*. Academic Press, pp. 209–217.

Bassareo, V. & Di Chiara, G. (1999) Differential responsiveness of dopamine transmission to food-stimuli in nucleus accumbens shell/core compartments. *Neuroscience*, **89**, 637–641.

Beach, F.A. & Jordan, L. (1956) Sexual exhaustion and recovery in the male rat. *Q. J. Exp. Psychol.*, **8**, 121–133.

Becker, H.C., Griffin, W.C., & Lopez, M.F. (2013) Neuroadaptive Changes that Result from Chronic Drug Exposure. In *Biological Research on Addiction*. Elsevier Inc., pp. 169–178.

Berke, J.D. (2018) What does dopamine mean ? *Nat. Neurosci.*,.

Berridge, K.C. & Kringelbach, M.L. (2015) Pleasure Systems in the Brain. *Neuron*, **86**, 646–664.

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

Berry, M.S., Bruner, N.R., Herrmann, E.S., Johnson, P.S., & Johnson, M.W. (2022) Methamphetamine administration dose effects on sexual desire, sexual decision making, and delay discounting. *Exp. Clin. Psychopharmacol.*,.

Bhimani, R. V., Vik, M., Wakabayashi, K.T., Szalkowski, C., Bass, C.E., & Park, J. (2021) Distinct dose-dependent effects of methamphetamine on real-time dopamine transmission in the rat nucleus accumbens and behaviors. *J. Neurochem.*, **158**, 865–879.

Blum, K., Gardner, E., Oscar-Berman, M., & Gold, M. (2012) “Liking” and “Wanting” Linked to Reward Deficiency Syndrome (RDS): Hypothesizing Differential Responsivity in Brain Reward Circuitry. *Curr. Pharm. Des.*, **18**, 113–118.

Boye, S.M., Grant, R.J., & Clarke, P.B.S. (2001) Disruption of dopaminergic neurotransmission in nucleus accumbens core inhibits the locomotor stimulant effects of nicotine and D-amphetamine in rats. *Neuropharmacology*, **40**, 792–805.

Bradley, K.C. & Meisel, R.L. (2001) Sexual behavior induction of c-Fos in the nucleus accumbens and amphetamine-stimulated locomotor activity are sensitized by previous sexual experience in female syrian hamsters. *J. Neurosci.*, **21**, 2123–2130.

Bradley, K.C., Mullins, A.J., Meisel, R.L., & Watts, V.J. (2004) Sexual experience alters D1 receptor-mediated cyclic AMP production in the nucleus accumbens of female Syrian hamsters. *Synapse*, **53**, 20–27.

Broom, S.L. & Yamamoto, B.K. (2005) Effects of subchronic methamphetamine exposure on basal dopamine and stress-induced dopamine release in the nucleus accumbens shell of rats. *Psychopharmacology (Berl).*, **181**, 467–476.

Brown, P.L., Wise, R. a, & Kiyatkin, E. a (2003) Brain hyperthermia is induced by methamphetamine and exacerbated by social interaction. *J. Neurosci.*, **23**, 3924–3929.

Butcher, S.P., Fairbrother, I.S., Kelly, J.S., & Arbuthnott, G.W. (1988) Amphetamine-induced dopamine release in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. *J. Neurochem.*, **50**, 346–355.

Camp, D.M., Browman, K.E., & Robinson, T.E. (1994) The effects of methamphetamine and cocaine on motor behavior and extracellular dopamine in the ventral striatum of Lewis versus Fischer 344 rats. *Brain Res.*, **668**, 180–193.

Canseco-Alba, A., Coffeen, U., Jaimes, O., Pellicer, F., & Rodríguez-Manzo, G. (2022) The nucleus accumbens dopamine increase, typically triggered by sexual stimuli in male rats, is no longer produced when animals are sexually inhibited due to sexual satiety. *Psychopharmacology (Berl).*, **Nov;239**, 3679–3695.

Canseco-Alba, A. & Rodríguez-Manzo, G. (2016) Intra-VTA anandamide infusion produces dose-based biphasic effects on male rat sexual behavior expression. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **150**–**151**, 182–189.

Carr, G.D., Phillips, A.G., & Fibiger, H.C. (1988) Independence of amphetamine reward from locomotor stimulation demonstrated by conditioned place preference. *Psychopharmacology (Berl).*, **94**, 221–226.

Chauhan, H., Killinger, B.A., Miller, C. V., & Moszczynska, A. (2014) Single and binge methamphetamine administrations have different effects on the levels of dopamine D2 autoreceptor and dopamine transporter in rat striatum. *Int. J. Mol. Sci.*, **15**, 5884–5906.

Cloutier, S., Wahl, K., Baker, C., & Newberry, R.C. (2014) The social buffering effect of playful handling on responses to repeated intraperitoneal injections in laboratory rats. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, **53**, 168–173.

Conti, L.H., Segal, D.S., & Kuczenski, R. (1997) Maintenance of amphetamine induced stereotypy and locomotion requires ongoing dopamine receptor activation. *Psychopharmacology (Berl).*, **130**, 183–188.

Corbit, L.H., Muir, J.L., & Balleine, B.W. (2001) The role of the nucleus accumbens in instrumental conditioning: Evidence of a functional dissociation between accumbens core and shell. *J. Neurosci.*, **21**, 3251–3260.

Costall, B., Naylor, R.J., Cannon, J.G., & Lee, T. (1977) Differentiation of the dopamine mechanisms mediating stereotyped behaviour and hyperactivity in the nucleus accumbens and caudate-putamen. *J. Pharm. Pharmacol.*, **29**, 337–342.

Dai, B., Sun, F., Tong, X., Ding, Y., Kuang, A., Osakada, T., Li, Y., & Lin, D. (2022) Responses and functions of dopamine in nucleus accumbens core during social behaviors. *Cell Rep.*, **40**, 111246.

Daiwile, A.P., Jayanthi, S., & Cadet, J.L. (2022) Sex differences in methamphetamine use disorder perused from pre-clinical and clinical studies: Potential therapeutic impacts. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **137**, 104674.

Damsma, G., Pfaus, J., Wenkstern, D., Phillips, A., & Fibiger, H. (1992) Sexual behaviour increases dopamine transmission in the nucleus accumbens and striatum of male rats: comparison with novelty and locomotion. *Behav. Neurosci.*, **106**, 181–191.

de Jong, J.W., Fraser, K.M., & Lammel, S. (2022) Mesoaccumbal Dopamine Heterogeneity: What Do Dopamine Firing and Release Have to Do with It? *Annu. Rev. Neurosci.*, **45**, 109–129.

Del Arco, A., González-Mora, J.L., Armas, V.R., & Mora, F. (1999) Amphetamine increases the extracellular concentration of glutamate in striatum of the awake rat: Involvement of high affinity transporter mechanisms. *Neuropharmacology*, **38**, 943–954.

Di Chiara, G. & Imperato, A. (1988a) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**, 5274–5278.

Di Chiara, G. & Imperato, A. (1988b) Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats. *J Pharmacol Exp Ther*, **244**, 1067–1080.

Domino, E.F. (2001) Nicotine induced behavioral locomotor sensitization. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, **25**, 59–71.

Egenrieder, L., Mitricheva, E., Spanagel, R., & Noori, H.R. (2020) No basal or drug-induced sex differences in striatal dopaminergic levels: a cluster and meta-analysis of rat microdialysis studies. *J. Neurochem.*, **152**, 482–492.

Eibergen, R.D. & Caggiula, A.R. (1973) Ventral midbrain involvement in copulatory behavior of the male rat. *Physiol. Behav.*, **10**, 435–441.

Ericson, M., Ulenius, L., Andrén, A., Jonsson, S., Adermark, L., & Söderpalm, B. (2019) Different dopamine tone in ethanol high- and low-consuming Wistar rats. *Addict. Biol.*, 1–9.

Fiorino, D.F., Coury, A., & Phillips, A.G. (1997) Dynamic changes in nucleus accumbens dopamine efflux during the coolidge effect in male rats. *J. Neurosci.*, **17**, 4849–4855.

Fowler, S.C. (2010) Motor Activity and Stereotypy. In Stolerman, I.P. (ed), *Encyclopedia of Psychopharmacology*. Springer Nature, pp. 799–805.

Frohmader, K.S., Bateman, K.L., Lehman, M.N., & Coolen, L.M. (2010) Effects of methamphetamine on sexual performance and compulsive sex behavior in male rats. *Psychopharmacology (Berl).*, **212**, 93–104.

Garduño-Gutiérrez, R., León-Olea, M., & Rodríguez-Manzo, G. (2013a) Different amounts of ejaculatory activity, a natural rewarding behavior, induce differential mu and delta opioid receptor internalization in the rat's ventral tegmental area. *Brain Res.*, **1541**, 22–32.

Garduño-Gutiérrez, R., León-Olea, M., & Rodríguez-Manzo, G. (2013b) 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. *Behav. Brain Res.*, **256**, 64–71.

Garduño-Gutiérrez, R., León-Olea, M., & Rodríguez-Manzo, G. (2018) Opioid receptor and β-arrestin2 densities and distribution change after sexual experience in the ventral tegmental area of male rats. *Physiol. Behav.*, **189**, 107–115.

Gatica, R.I., Aguilar-Rivera, M.Í., Azocar, V.H., & Fuentealba, J.A. (2020) Individual Differences in Amphetamine Locomotor Sensitization are Accompanied with Changes in Dopamine Release and Firing Pattern in the Dorsolateral Striatum of Rats. *Neuroscience*, **427**, 116–126.

Gehrke, B.J., Cass, W.A., & Bardo, M.T. (2006) Monoamine-depleting doses of methamphetamine in enriched and isolated rats: Consequences for subsequent methamphetamine-induced hyperactivity and reward. *Behav. Pharmacol.*, **17**,

499–508.

Gehrke, B.J., Harrod, S.B., Cass, W.A., & Bardo, M.T. (2003) The effect of neurotoxic doses of methamphetamine on methamphetamine-conditioned place preference in rats. *Psychopharmacology (Berl).*, **166**, 249–257.

Gentry, W., Ghafoor, A., Wessinger, W., Laurenzana, E., Hendrickson, H., & Owens, S. (2004) (+)-Methamphetamine-induced spontaneous behavior in rats depends on route of (+)METH administration. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **79**, 751–760.

George, O., Le Moal, M., & Koob, G.F. (2012) Allostasis and addiction: Role of the dopamine and corticotropin-releasing factor systems. *Physiol. Behav.*, **106**, 58–64.

German, C.L., Hanson, G.R., & Fleckenstein, A.E. (2012) Amphetamine and methamphetamine reduce striatal dopamine transporter function without concurrent dopamine transporter relocalization. *J. Neurochem.*, **123**, 288–297.

Giorgetti, R., Tagliabracci, A., Schifano, F., Zaami, S., Marinelli, E., & Busardò, F.P. (2017) When “Chems” Meet Sex: A Rising Phenomenon Called “ChemSex.” *Curr. Neuropharmacol.*, **15**, 762–770.

González-Morales, E. & Rodríguez-Manzo, G. (2020) Endocannabinoids mediate long-lasting behavioural and physiological changes in male rats induced by the repeated activation of the mesolimbic system by copulation to satiety. *Behav. Brain Res.*, **383**, 1–11.

Grace, A.A., Floresco, S.B., Goto, Y., & Lodge, D.J. (2007) Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends Neurosci.*, **30**, 220–227.

Grilly, D.M. & Loveland, A. (2001) What is a “low dose” of d-amphetamine for inducing behavioral effects in laboratory rats? *Psychopharmacology (Berl).*, **153**, 155–169.

Gu, S.M., Cha, H.J., Seo, S.W., Hong, J.T., & Yun, J. (2019) Dopamine D1 receptor antagonist reduces stimulant-induced conditioned place preferences and dopamine receptor supersensitivity. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.*, **393**, 131–138.

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

Guadarrama-Bazante, I.L. & Rodríguez-Manzo, G. (2019) Nucleus accumbens dopamine increases sexual motivation in sexually satiated male rats. *Psychopharmacology (Berl).*,.

Hall, D.A., Stanis, J.J., Marquez Avila, H., & Gulley, J.M. (2008) A comparison of amphetamine- and methamphetamine-induced locomotor activity in rats: Evidence for qualitative differences in behavior. *Psychopharmacology (Berl).*, **195**, 469–478.

Hassan, S.F., Wearne, T.A., Cornish, J.L., & Goodchild, A.K. (2016) Effects of acute and chronic systemic methamphetamine on respiratory, cardiovascular and metabolic function, and cardiorespiratory reflexes. *J. Physiol.*, **594**, 763–780.

Hiroi, N. & White, N.M. (1991) The amphetamine conditioned place preference: differential involvement of dopamine receptor subtypes and two dopaminergic terminal areas. *Brain Res.*, **552**, 141–152.

Hofford, R.S., Darna, M., Wilmouth, C.E., Dwoskin, L.P., & Bardo, M.T. (2014) Environmental enrichment reduces methamphetamine cue-induced reinstatement but does not alter methamphetamine reward or VMAT2 function. *Behav. Brain Res.*, **270**, 151–158.

Hull, E.M., Meisel, R.L., & Sachs, B.D. (2002) Male Sexual Behavior. In Pfaff, D.., Arnold, A.P., Etgen, A.M., Fahrbach, S.E., & Rubin, R.T. (eds), *Hormones, Brain and Behavior*. Elsevier Science, pp. 3–137.

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

Ikemoto, S. (2007) Dopamine reward circuitry: Two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res. Rev.*, **56**, 27–78.

Ikemoto, S. & Panksepp, J. (1999) The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: A unifying interpretation with special reference to reward-seeking. *Brain Res. Rev.*, **31**, 6–41.

Ito, C., Onodera, K., Watanabe, T., & Sato, M. (1997) Effects of histamine agents on methamphetamine-induced stereotyped behavior and behavioral sensitization in rats. *Psychopharmacology (Berl).*, **130**, 362–367.

Iwata, S., Hewlett, G., Ferrell, S., Kantor, L., & Gnegy, M.E. (1997) Enhanced dopamine release and phosphorylation of synapsin I and neuromodulin in striatal synaptosomes after repeated amphetamine. *J Pharmacol Exp Ther.*, **3**, 1445–1452.

Izawa, J., Yamanashi, K., Asakura, T., Misu, Y., & Goshima, Y. (2006) Differential effects of methamphetamine and cocaine on behavior and extracellular levels of dopamine and 3,4-dihydroxyphenylalanine in the nucleus accumbens of conscious rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **549**, 84–90.

Jansen, K.L.R. & Theron, L. (2006) Ecstasy (MDMA), methamphetamine, and date rape (drug-facilitated sexual assault): A consideration of the issues. *J. Psychoactive Drugs*, **38**, 1–12.

Jing, L., Zhang, M., Li, J.X., Huang, P., Liu, Q., Li, Y.L., Liang, H., & Liang, J.H. (2014) Comparison of single versus repeated methamphetamine injection induced behavioral sensitization in mice. *Neurosci. Lett.*, **560**, 103–106.

Jing, L., Zhang, Y., & Li, J.X. (2014) Effects of the trace amine associated receptor 1 agonist RO5263397 on abuse-related behavioral indices of methamphetamine in rats. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **18**, 1–7.

Johnson, A.R., Banks, M.L., Selley, D.E., & Negus, S.S. (2018) Amphetamine maintenance differentially modulates effects of cocaine, methylenedioxypyrovalerone (MDPV), and methamphetamine on intracranial self-stimulation and nucleus accumbens dopamine in rats.

Neuropsychopharmacology, **43**, 1753–1762.

Kalivas, P., Sorg, B., & Hooks, M. (1993) The pharmacology and neural circuitry of sensitization to psychostimulants. *Behav Pharmacol.*, **4**, 315–334.

Karch, S.B. & Drummer, O.H. (2016) Synthetic Stimulants. In *Karch's Pathology of Drug Abuse*, 5th edn. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL), pp. 273–364.

Karen, L.M. & Barfield, R.J. (1975) Differential rates of exhaustion and recovery of several parameters of male rat sexual behavior. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **88**, 693–703.

Karkhanis, A.N., Leach, A.C., Yorgason, J.T., Uneri, A., Barth, S., Niere, F., Alexander, N.J., Weiner, J.L., McCool, B.A., Raab-Graham, K.F., Ferris, M.J., & Jones, S.R. (2019) Chronic Social Isolation Stress during Peri-Adolescence Alters Presynaptic Dopamine Terminal Dynamics via Augmentation in Accumbal Dopamine Availability. *ACS Chem. Neurosci.*, **10**, 2033–2044.

Kelley, A.E. & Berridge, K.C. (2002) The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J. Neurosci.*, **22**, 3306–3311.

Khanegheini, A., Khani, M., Zarrabian, S., Yousefzadeh-Chabok, S., Taleghani, B.K., & Haghparast, A. (2021) Cannabidiol enhanced the development of sensitization to the expression of methamphetamine-induced conditioned place preference in male rats. *J. Psychiatr. Res.*, **137**, 260–265.

Kohlert, J.G. & Meisel, R.L. (1999) Sexual experience sensitizes mating-related nucleus accumbens dopamine responses of female Syrian hamsters. *Behav. Brain Res.*, **99**, 45–52.

Koob, G.F. & Le Moal, M. (2001) Drug Addiction, Dysregulation of Reward, and Allostasis. *Neuropsychopharmacology*, **24**, 97–129.

Kremer, Y., Flakowski, J., Rohner, C., & Lüscher, C. (2020) Context-dependent multiplexing by individual VTA dopamine neurons. *J. Neurosci.*, **40**, 7489–7509.

Kuczenski, R., Segal, D.S., & Aizenstein, M.L. (1991) Amphetamine, cocaine, and fencamfamine: Relationship between locomotor and stereotypy response profiles and caudate and accumbens dopamine dynamics. *J. Neurosci.*, **11**, 2703–2712.

Le Moal, M. & Simon, H. (1991) Mesocorticolimbic dopaminergic network: Functional and regulatory roles. *Physiol. Rev.*, **71**, 155–234.

Lessov, C.N., Palmer, A.A., Quick, E.A., & Phillips, T.J. (2001) Voluntary ethanol drinking in C57BL/6J and DBA/2J mice before and after sensitization to the locomotor stimulant effects of ethanol. *Psychopharmacology (Berl).*, **155**, 91–99.

López, H.H. & Ettenberg, A. (2002) Exposure to female rats produces differences in c-fos induction between sexually-naïve and experienced male rats. *Brain Res.*, **947**, 57–66.

Lu, W. & Wolf, M.E. (1999) Repeated amphetamine administration alters AMPA receptor subunit expression in rat nucleus accumbens and medial prefrontal cortex. *Synapse*, **32**, 119–131.

Luis-Ravelo, D., Fumagallo-Reading, F., Castro-Hernandez, J., Barroso-Chinea, P., Afonso-Oramas, D., Febles-Casquero, A., Cruz-Muros, I., Salas-Hernandez, J., Mesa-Infante, V., Rodriguez-Nuñez, J., & Gonzalez-Hernandez, T. (2021) Prolonged dopamine D3 receptor stimulation promotes dopamine transporter ubiquitination and degradation through a PKC-dependent mechanism. *Pharmacol. Res.*, **165**, 1–17.

Lüscher, C. & Malenka, R.C. (2011) Drug-Evoked Synaptic Plasticity in Addiction: From Molecular Changes to Circuit Remodeling. *Neuron*, **69**, 650–663.

Mathews, T.A., Brookshire, B.R., Budygin, E.A., Hamre, K., Goldowitz, D., & Jones, S.R. (2009) Ethanol-induced hyperactivity is associated with hypodopaminergia in the 22-TNJ ENU-mutated mouse. *Alcohol*, **43**, 421–431.

Matsumoto, J., Urakawa, S., Hori, E., de Araujo, M.F.P., Sakuma, Y., Ono, T., & Nishijo, H. (2012) Neuronal Responses in the Nucleus Accumbens Shell during Sexual Behavior in Male Rats. *J. Neurosci.*, **32**, 1672–1686.

McKendrick, G. & Graziane, N.M. (2020) Drug-Induced Conditioned Place Preference and Its Practical Use in Substance Use Disorder Research. *Front. Behav. Neurosci.*, **14**, 1–15.

Melega, W.P., Williams, A.E., Schmitz, D.A., DiStefano, E.W., & Cho, A.K. (1995) Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of the actions of D-amphetamine and D-methamphetamine on the dopamine terminal. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **274**, 90 LP – 96.

Meyer, J.S. & Quenzer, L.F. (2019a) Catecholamines. In *Psychopharmacology. Drugs, the Brain, and Behavior*, 3rd edn. Oxford University Press, New York, pp. 159–187.

Meyer, J.S. & Quenzer, L.F. (2019b) Drug Abuse and Addiction. In *Psychopharmacology. Drugs, the Brain, and Behavior*, 3rd edn. Oxford University Press, New York, pp. 265–304.

Milesi-Halle', A., McMillan, D.., Laurenzana, E.., Byrnes, K.., & Owens, S.. (2007) Sex Differences in (+)-Amphetamine-and (+)-Methamphetamine-induced Behavioral REsponse in Male and Female Sprague-Mcmahon, T., Zijl, P. C. M. Van, & Gilad, A. A. (2007). Sex Differences in (+)-Amphetamine-and (+)-Methamphetamine-induced Behavioral REspons. *Pharmacol Biochem Behav*, **86**, 140–149.

Mohebi, A., Pettibone, J.R., Hamid, A.A., Wong, J.M.T., Vinson, L.T., Patriarchi, T., Tian, L., Kennedy, R.T., & Berke, J.D. (2019) Dissociable dopamine dynamics for learning and motivation. *Nature*, **570**, 65–70.

Mueller, D. & de Wit, H. (2011) Conditioned Place Preference in Rodents and Humans. In Raber, J. (ed), *Animal Models of Behavioral Analysis*. Humana Press, New York, pp. 133–152.

Nall, R.W., Heinsbroek, J.A., Nentwig, T.B., Kalivas, P.W., & Bobadilla, A.C. (2021) Circuit selectivity in drug versus natural reward seeking behaviors. *J. Neurochem.*, **157**, 1450–1472.

Nieh, E.H., Vander Weele, C.M., Matthews, G.A., Presbrey, K.N., Wichmann, R., Leppla, C.A., Izadmehr, E.M., & Tye, K.M. (2016) Inhibitory Input from the Lateral

Hypothalamus to the Ventral Tegmental Area Disinhibits Dopamine Neurons and Promotes Behavioral Activation. *Neuron*, **90**, 1286–1298.

Olney, J.J., Warlow, S.M., Naffziger, E.E., & Berridge, K.C. (2018) Current perspectives on incentive salience and applications to clinical disorders. *Curr. Opin. Behav. Sci.*, **22**, 59–69.

Páez-Martínez, N., Pellicer, F., González-Trujano, M.E., & Cruz-López, B. (2020) Environmental enrichment reduces behavioural sensitization in mice previously exposed to toluene: The role of D1 receptors. *Behav. Brain Res.*, **390**, 112624.

Palmiter, R.D. (2008) Dopamine signaling in the dorsal striatum is essential for motivated behaviors: Lessons from dopamine-deficient mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1129**, 35–46.

Parkinson, J.A., Olmstead, M.C., Burns, L.H., Robbins, T.W., & Everitt, B.J. (1999) Dissociation in effects of lesions of the nucleus accumbens core and shell on appetitive Pavlovian approach behavior and the potentiation of conditioned reinforcement and locomotor activity by D-amphetamine. *J. Neurosci.*, **19**, 2401–2411.

Paxinos, G. & Watson, C. (2009) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Compact 6t. edn. Academic Press, Elsevier, UK.

Pecina, S., Cagniard, B., Berridge, K.C., Aldridge, J.W., & Zhuang, X. (2004) Hyperdopaminergic Mutant Mice Have Higher "Wanting" But Not "Liking" for Sweet Rewards. *Behav. Pharmacol.*, **15**, A24.

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 Res.*, **530**, 345–348.

Pfeiffer, C.A. & Johnston, R.E. (1994) Hormonal and behavioral responses of male hamsters to females and female odors: Roles of olfaction, the vomeronasal system, and sexual experience. *Physiol. Behav.*, **55**, 129–138.

Phillips, T.J., Pastor, R., Scibelli, A.C., Reed, C., & Tarragón, E. (2011) Behavioral Sensitization to Addictive Drugs: Clinical Relevance and Methodological Aspects. In Raber, J. (ed), *Animal Models of Behavioral Analysis*. Humana Press, New York, pp. 267–305.

Pierce, R.C. & Kalivas, P.W. (1995) Amphetamine produces sensitized increases in locomotion and extracellular dopamine preferentially in the nucleus accumbens shell of rats administered repeated cocaine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **275**, 1019–1029.

Pierce, R.C. & Kalivas, P.W. (1997) A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res. Rev.*, **25**, 192–216.

Pierce, R.C. & Kalivas, P.W. (2007) Locomotor behavior. *Curr. Protoc. Neurosci.*, **8–1**, 1–9.

Pitchers, K.K., Balfour, M.E., Lehman, M.N., Richtand, N.M., Yu, L., & Coolen, L.M. (2010) Neuroplasticity in the Mesolimbic System Induced by Natural Reward and Subsequent Reward Abstinence. *Biol. Psychiatry*, **67**, 872–879.

Pitchers, K.K., Coppens, C.M., Beloate, L.N., Fuller, J., Van, S., Frohmader, K.S., Laviolette, S.R., Lehman, M.N., & Coolen, L.M. (2014) Endogenous Opioid-Induced Neuroplasticity of Dopaminergic Neurons in the Ventral Tegmental Area Influences Natural and Opiate Reward. *J. Neurosci.*, **34**, 8825–8836.

Pitchers, K.K., Schmid, S., Di Sebastiano, A.R., Wang, X., Laviolette, S.R., Lehman, M.N., & Coolen, L.M. (2012) Natural reward experience alters AMPA and NMDA receptor distribution and function in the nucleus accumbens. *PLoS One*, **7**.

Reddy, P.K.V., Ng, T.M.H., Oh, E.E., Moady, G., & Elkayam, U. (2020) Clinical characteristics and management of methamphetamine-associated cardiomyopathy: State-of-the-art review. *J. Am. Heart Assoc.*, **9**, 1–11.

Reith, M.E.A. & Gnegy, M.E. (2020) Molecular Mechanisms of Amphetamines. In Nader, M. & Hurd, Y. (eds), *Substance Use Disorders. Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer Nature, pp. 265–297.

Robinson, T.E. (2010) Sensitization to Drugs. In Stolerman, I.P. (ed), *Encyclopedia of Psychopharmacology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1203–1208.

Robinson, T.E. & Berridge, K.C. (1993) The neural basis of drug craving: An incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res. Rev.*, **18**, 247–291.

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. *Eur. J. Pharmacol.*, **372**, 1–8.

Rodríguez-Manzo, G. & Canseco-Alba, A. (2014) A Role for Learning and Memory in the Expression of an Innate Behavior: The Case of Copulatory Behavior. In Meneses, A. (ed), *Identification of Neural Markers Accompanying Memory*. Elsevier, pp. 135–147.

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

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

Rodríguez-Manzo, G. & Fernández-Guasti, A. (1995) Saciedad Sexual. In *Temas Selectos de Neurociencias*, Velázquez,. edn. Universidad Autónoma Metropolitana, pp. 229–248.

Rodríguez-Manzo, G., González-Morales, E., & Garduño-Gutiérrez, R. (2021) Endocannabinoids Released in the Ventral Tegmental Area During Copulation to Satiety Modulate Changes in Glutamate Receptors Associated With Synaptic Plasticity Processes. *Front. Synaptic Neurosci.*, **13**, 1–15.

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? *Behav. Brain Res.*, **217**, 253–260.

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. *Behav. Brain Res.*, **179**, 310–313.

Rodríguez-Manzo, G. & Pellicer, F. (2010) Electrical stimulation of dorsal and ventral striatum differentially alters the copulatory behavior of male rats. *Behav. Neurosci.*, **124**, 686–694.

Rossetti, Z.L., Hmaidan, Y., & Gessa, G.L. (1992) Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: a common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **221**, 227–234.

Rothman, R.B. & Baumann, M.H. (2003) Monoamine transporters and psychostimulant drugs. *Eur. J. Pharmacol.*, **479**, 23–40.

Rothman, R.B., Baumann, M.H., Dersch, C.M., Romero, D. V., Rice, K.C., Carroll, F.I., & Partilla, J.S. (2001) Amphetamine-type central nervous system stimulants release norepinephrine more potently than they release dopamine and serotonin. *Synapse*, **39**, 32–41.

Russo, S.J. & Nestler, E.J. (2013) The brain reward system & mood disorders. *Nat. Rev. Neurosci.*, **14**, 609–625.

Sackett, D.A., Saddoris, M.P., & Carelli, R.M. (2017) Nucleus accumbens shell dopamine preferentially tracks information related to outcome value of reward. *eNeuro*, **4**, 1–10.

Samaha, A.N., Khoo, S.Y.S., Ferrario, C.R., & Robinson, T.E. (2021) Dopamine 'ups and downs' in addiction revisited. *Trends Neurosci.*, **44**, 516–526.

Sanna, A., Fattore, L., Badas, P., Corona, G., & Diana, M. (2021) The hypodopaminergic state ten years after: transcranial magnetic stimulation as a tool to test the dopamine hypothesis of drug addiction. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **56**, 61–67.

Schindler, C.W., Bross, J.G., & Thorndike, E.B. (2002) Gender differences in the behavioral effects of methamphetamine. *Eur. J. Pharmacol.*, **442**, 231–235.

Scholl, J.L., Feng, N., Watt, M.J., Renner, K.J., & Forster, G.L. (2009) Individual differences in amphetamine sensitization, behavior and central monoamines. *Physiol. Behav.*, **96**, 493–504.

Sellings, L.H.L. & Clarke, P.B.S. (2003) Segregation of amphetamine reward and locomotor stimulation between nucleus accumbens medial shell and core. *J. Neurosci.*, **23**, 6295–6303.

Shizgal, P.B. & Hyman, S.E. (2013) Homeostasis, Motivation, and Addictive States. In *Principles of Neural Science*, 5th edn. McGraw-Hill, pp. 1095–1113.

Siciliano, C.A., Calipari, E.S., Ferris, M.J., & Jones, S.R. (2015) Adaptations of presynaptic dopamine terminals induced by psychostimulant self-administration. *ACS Chem. Neurosci.*, **6**, 27–36.

Singh, R.A.K., Kosten, T.A., Kinsey, B.M., Shen, X., Lopez, A.Y., Kosten, T.R., & Orson, F.M. (2012) Dose-dependent changes in the locomotor responses to methamphetamine in BALB/c mice: Low doses induce hypolocomotion. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **103**, 230–236.

Staffend, N.A., Hedges, V.L., Chemel, B.R., Watts, V.J., & Meisel, R.L. (2014) Cell-type specific increases in female hamster nucleus accumbens spine density

following female sexual experience. *Brain Struct. Funct.*, **219**, 2071–2081.

Staton, D.M. & Solomon, P.R. (1984) Microinjections of d-amphetamine into the nucleus accumbens and caudate-putamen differentially affect stereotypy and locomotion in the rat. *Physiol. Psychol.*, **12**, 159–162.

Steketee, J.D. & Kalivas, P.W. (2011) Drug wanting: Behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacol. Rev.*, **63**, 348–365.

Stojanovic, T., Orlova, M., Sialana, F.J., Höger, H., Stuchlik, S., Milenkovic, I., Aradska, J., & Lubec, G. (2017) Validation of dopamine receptor DRD1 and DRD2 antibodies using receptor deficient mice. *Amino Acids*, **49**, 1101–1109.

Stromberg, M.F. & Mackler, S.A. (2005) The effect of cocaine on the expression of motor activity and conditioned place preference in high and low alcohol-preferring Wistar rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **82**, 314–319.

Sulzer, D., Sonders, M.S., Poulsen, N.W., & Galli, A. (2005) Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: A review. *Prog. Neurobiol.*, **75**, 406–433.

Sun, W., Ginovart, N., Ko, F., Seeman, P., & Kapur, S. (2003) In vivo evidence for dopamine-mediated internalization of D2-receptors after amphetamine: Differential findings with [3H]raclopride versus [3H]spiperone. *Mol. Pharmacol.*, **63**, 456–462.

Taslimi, Z., Komaki, A., Haghparast, A., & Sarihi, A. (2018) Effects of acute and chronic restraint stress on reinstatement of extinguished methamphetamine-induced conditioned place preference in rats. *Basic Clin. Neurosci.*, **9**, 157–166.

Tenk, C.M., Wilson, H., Zhang, Q., Pitchers, K.K., & Coolen, L.M. (2009) Sexual reward in male rats: Effects of sexual experience on conditioned place preferences associated with ejaculation and intromissions. *Horm. Behav.*, **55**, 93–97.

Thorn, D.A., Winter, J.C., & Li, J.X. (2012) Agmatine attenuates methamphetamine-induced conditioned place preference in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **680**, 69–72.

Threlfell, S., Lalic, T., Platt, N.J., Jennings, K.A., Deisseroth, K., & Cragg, S.J. (2012) Striatal dopamine release is triggered by synchronized activity in cholinergic interneurons. *Neuron*, **75**, 58–64.

Trujillo, K.A., Kubota, K.S., & Warmoth, K.P. (2004) Continuous administration of opioids produces locomotor sensitization. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **79**, 661–669.

Tzschentke, T.M. (1998) Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog Neurobiol*, **56**, 613–672.

Tzschentke, T.M. (2007) Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: Update of the last decade. *Addict. Biol.*, **12**, 227–462.

Vanderschuren, L.J.M.J. & Kalivas, P.W. (2000) Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berl).*,

151, 99–120.

Volkow, N.D., Michaelides, M., & Baler, R. (2019) The neuroscience of drug reward and addiction. *Physiol. Rev.*, **99**, 2115–2140.

Wang, Q., Li, D., Bubula, N., Campioni, M.R., McGehee, D.S., & Vezina, P. (2017) Sensitizing exposure to amphetamine increases AMPA receptor phosphorylation without increasing cell surface expression in the rat nucleus accumbens. *Neuropharmacology*, **117**, 328–337.

Wenkstern, D., Pfaus, J.G., & Fibiger, H.C. (1993) Dopamine transmission increases in the nucleus accumbens of male rats during their first exposure to sexually receptive female rats. *Brain Res.*, **618**, 41–46.

West, C.H.K., Clancy, A.N., & Michael, R.P. (1992) Enhanced responses of nucleus accumbens neurons in male rats to novel odors associated with sexually receptive females. *Brain Res.*, **585**, 49–55.

Wise, R.A. (2009) Roles for nigrostriatal-not just mesocorticolimbic-dopamine in reward and addiction. *Trends Neurosci.*, **32**, 517–524.

Wolf, M.E., White, F.J., & Hu, X.T. (1994) MK-801 prevents alterations in the mesoaccumbens dopamine system associated with behavioral sensitization to amphetamine. *J. Neurosci.*, **14**, 1735–1745.

Woodson, J.C. (2002) Including “learned sexuality” in the organization of sexual behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **26**, 69–80.

Xue, C.J., Ng, J.P., Li, Y., & Wolf, M.E. (1996) Acute and repeated systemic amphetamine administration: Effects on extracellular glutamate, aspartate, and serine levels in rat ventral tegmental area and nucleus accumbens. *J. Neurochem.*, **67**, 352–363.

Yager, L.M., Garcia, A.F., Wunsch, A.M., & Ferguson, S.M. (2015) The ins and outs of the striatum: Role in drug addiction. *Neuroscience*, **301**, 529–541.

Zakharova, E., Leoni, G., Kichko, I., & Izenwasser, S. (2009) Differential effects of methamphetamine and cocaine on conditioned place preference and locomotor activity in adult and adolescent male rats. *Behav. Brain Res.*, **198**, 45–50.

Zhang, Y., Loonam, T.M., Noailles, P.A.H., & Angulo, J.A. (2006) Comparison of cocaine- and methamphetamine-evoked dopamine and glutamate overflow in somatodendritic and terminal field regions of the rat brain during acute, chronic, and early withdrawal conditions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **937**, 93–120.

Anexos

Psychopharmacology
https://doi.org/10.1007/s00213-023-06322-w

ORIGINAL INVESTIGATION

Sexual satiety modifies methamphetamine-induced locomotor and rewarding effects and dopamine-related protein levels in the striatum of male rats

Valeria Violante-Soria[1] · Silvia L. Cruz[1] · Gabriela Rodríguez-Manzo[1]

Received: 31 October 2022 / Accepted: 18 January 2023
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2023

Abstract

Rationale Drug and natural rewarding stimuli activate the mesolimbic dopaminergic system. Both methamphetamine (Meth) and copulation to satiety importantly increase dopamine (DA) release in the nucleus accumbens (NAc), but with differences in magnitude. This paper analyzes the interaction between Meth administration and the intense sexual activity associated with sexual satiety.

Objectives To evaluate possible changes in Meth-induced behavioral effects and striatal DA-related protein expression due to sexual satiety.

Methods Meth-induced locomotor activity and conditioned place preference (CPP) were tested in sexually experienced male rats that copulated to satiety (S–S) or ejaculated once (1E) the day before or displayed no sexual activity (control group; C). DA receptors and DA transporter expression were determined by western blot in the striatum of animals of all sexual conditions treated with specific Meth doses.

Results Meth's locomotor and rewarding effects were exacerbated in S–S animals, while in 1E rats, only locomotor effects were enhanced. Sexual activity, by itself, modified DA-related protein expression in the NAc core and in the caudate-putamen (CPu), while Meth treatment alone changed their expression only in the NAc shell. Meth-induced changes in the NAc shell turned in the opposite direction when animals had sexual activity, and additional changes appeared in the NAc core and CPu of S–S rats.

Conclusion Sexual satiety sensitizes rats to Meth's behavioral effects and the Meth-induced striatal DA-related protein adaptations are modified by sexual activity, evidencing cross-sensitization between both stimuli.

Keywords Nucleus accumbens · Caudate-putamen · Male sexual behavior · Methamphetamine · Dopamine receptors · Dopamine transporter · Conditioned place preference · Hyperlocomotion · Mesolimbic system · Natural and drug rewards

Introduction

The mesolimbic dopaminergic system (ML-DA) comprises dopamine (DA) neurons located in the ventral tegmental area (VTA) that project to the nucleus accumbens (NAc), prefrontal cortex, and other limbic structures like the amygdala, septum, ventral pallidum, bed nucleus of the stria terminalis, and olfactory tubercle (Ikemoto and Panksepp 1999; Ikemoto 2007; Bardo 2013; Morales and Margolis 2017). Natural and drug-rewarding stimuli induce the release of accumbal DA, but to a different extent. For example, sexual activity and other natural rewarding behaviors increase DA extracellular concentrations in the NAc of rodents by around 150 to 200% (Pfaus et al. 1990; Damsma et al. 1992; Fiorino et al. 1997; Bassareo and Di Chiara 1999), whereas amphetamine-like drugs increase them by as far as 1000% (Butcher et al. 1988; Di Chiara and Imperato 1988; Kuczenski et al. 1991; Egenrieder et al. 2020).

When sexually experienced male rats are allowed to copulate ad libitum with a sexually receptive female, they will ejaculate repeatedly until becoming sexually satiated (S–S); typically, 5–12 ejaculations in a period of 2.5 h (Beach and Jordan 1956; Rodríguez-Manzo and Fernández-Guasti 1994; Hull and Rodríguez-Manzo 2017). Repeated ejaculation during copulation

✉ Gabriela Rodríguez-Manzo
grodrigu@cinvestav.mx

[1] Departamento de Farmacobiología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Cinvestav Sede Sur, 14330 Mexico City, Mexico

to satiety directly correlates with sustained DA elevation in the NAc, which returns to baseline levels once sexual activity ceases (Fiorino et al. 1997; Canseco-Alba et al. 2022). Rats that ejaculate only once (1E) show a NAc DA increase similar to that of animals that copulate to satiety, but this response lasts longer in the latter group. Differences between 1E and S–S males become more evident 24 h after finishing the sexual activity, when S–S rats exhibit physiological changes that suggest the occurrence of neuroadaptations. For instance, S–S animals have a hypodopaminergic basal tone in the NAc that does not occur in the 1E rats. Moreover, exposure to a sexually receptive female at this time (24 h after sexual activity) increases again DA levels in 1E animals but not in the S–S rats, in which DA levels decrease further (Canseco-Alba et al. 2022). Hence, the functioning of the ML-DA system is altered in S–S animals.

Methamphetamine (Meth) is a substrate for both the vesicular monoamine transporter (VMAT2) and the membrane DA transporter (DAT). By interacting with VMAT2, Meth causes the release of DA from the synaptic vesicles into the cytoplasm, where DA is recognized by DAT and, due to the activation of DAT reverse transport, DA is released into the synaptic cleft (Sulzer et al. 2005; Chiu and Schenk 2012; Reith and Gnegy 2020). As a result, Meth induces a massive DA release that is detected in the striatum (NAc and caudo-putamen (CPu) (Kuczenski et al. 1991; Shoblock et al. 2003; Izawa et al. 2006; Zhang et al. 2006).

Meth produces rewarding and motor effects (Hiroi and White 1991; Conti et al. 1997; Gu et al. 2019; Bhimani et al. 2021) related to DA receptor activation in the NAc, but the CPu, the VTA, and the prefrontal cortex also modulate them (Vanderschuren and Kalivas 2000; Tzschentke 2007). Rewarding effects occur at a broad range of Meth doses (Schindler et al. 2002; Zakharova et al. 2009; Thorn et al. 2012; Taslimi et al. 2018). In contrast, only low to moderate Meth doses increase spontaneous locomotor activity, because high doses produce stereotyped behaviors that limit locomotion (Grilly and Loveland 2001; Gentry et al. 2004; Hall et al. 2008; Jing et al. 2014a, b).

Both sexual activity and Meth activate the ML-DA and, as mentioned before, male rats that copulate to satiety appear to have a remodeled ML-DA circuit, which might modify Meth-induced effects. Thus, the aim of the present study was to evaluate Meth-induced motor and rewarding effects in S–S male rats as compared to animals that had 1E or no recent sexual activity and investigate possible changes in striatal D1 (D1R) and D2 dopamine receptors (D2R), and DAT expression associated with these stimuli.

Materials and methods

Animals

We used sexually experienced adult male Wistar rats (250–300 g body weight) in all our experiments. To render them sexually experienced, males were subjected to copulatory tests with receptive females, every other day. Males that ejaculated in less than 15 min in at least 3 out of 5 tests were considered sexually experienced. Sexually receptive intact adult female Wistar rats were used as sexual stimuli; sexual receptivity was induced by the sequential s.c. injection of estradiol benzoate (13 µg/rat) followed 24 h later by progesterone (7 mg/rat).

The Cinvestav-Sede Sur vivarium provided all animals, which were maintained in groups of 8 per cage, under an inverted light/dark cycle (12/12 h, lights on at 22:00 h) and controlled temperature (22 °C) and humidity (50–60%). Food and water were available ad libitum, except during the behavioral tests. Our Institutional Committee for the Care and Use of Laboratory Animals (Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, CICUAL) approved all experimental procedures (protocol 0230–16), which complied with the regulations established in the Mexican Official Norm for the use and care of laboratory animals (NOM-062-ZOO-1999), and the ARRIVE guidelines for in vivo experimentation (Kilkenny et al. 2013).

Sexual activity

Sexual activity was regulated by the males and took place in cylindrical polycarbonate arenas (60 × 40 cm) with a thick sawdust floor. Males were individually placed into the arena and allowed to habituate for 5 min before introducing a single sexually receptive female. Then, sexual interaction was allowed until completing one ejaculation or achieving the sexual satiety criterion, i.e., a 90-min period without ejaculation after the last ejaculatory response (Rodríguez-Manzo et al. 2011). Males were returned to their home cages at the end of the tests.

Drugs

Methamphetamine hydrochloride (purity confirmed by Fourier Transform Infrared Spectrometry) was donated by the Ministry of Health, Mexico City, Mexico. The drug was dissolved in 0.9% saline solution. Meth was i.p. administered for acute treatments and s.c. injected for repeated treatment in a final volume of 1 ml/kg. Meth solutions were freshly prepared before each use. Sodium pentobarbital (200 mg/kg, i.p., Pisa, Mexico City, Mexico) was used to anesthetize the animals before brain extraction.

Motor activity test

Motor activity was recorded with an electronic actimeter (Panlab, Barcelona, Spain) equipped with one infrared beam

frame (16 × 16 cells, 2.5 cm each, 3 cm above the floor) and coupled to an acrylic cage (45 × 45 × 45 cm). Data were recorded by Sedacom software (Panlab, Barcelona, Spain). The procedure began with the individual habituation of males to the apparatus (30 min), followed by drug or vehicle injection and movement recording for 60 min, at 3-min intervals. To eliminate odor traces, the apparatus was cleaned with ethanol (70%) between tests. The software recorded four types of movements: fast and slow ambulatory movements, and fast and slow stereotyped movements. Motor activity data are expressed as the sum of fast and slow ambulatory movements (locomotor activity) and the sum of slow and fast stereotyped movements.

Conditioned place preference (CPP) test

The CPP test allows the assessment of drugs' rewarding effects. The apparatus consisted of a two-chamber box (60 × 30 × 45 cm) divided by a central wall provided with a removable door (10 × 12 cm). Both compartments differed in color, lighting, and flooring. One had dark walls, indirect light, and a steel bar floor; the other had black/white striped walls, dim light, and a wire mesh floor. The protocol consisted of 3 phases, (1) habituation and pre-test, (2) conditioning, and (3) post-test (Mueller and de Wit 2011). All tests were conducted under white noise (60–65 dB). Habituation phase: A total of 4 independent habituation sessions were performed, 2 sessions per day, separated by a 5-h interval. In each session, rats were introduced individually into the apparatus and allowed free access to both compartments for 15 min. To determine the time spent in each compartment, the last habituation session (pre-test) was videorecorded and animals spending less than 30% of the time in one of the compartments were discarded. Conditioning phase: A biased design was used, in which the drug was administered in the compartment where the subject spent less time (non-preferred compartment), and the vehicle was administered in the compartment where the subject spent more time (preferred compartment). During the first conditioning session, half of the animals were introduced into the non-preferred compartment immediately after receiving the drug and maintained undisturbed for 30 min. During the second conditioning session of the day, the vehicle was administered in the preferred compartment and the animal was left inside for 30 min. During the following days, the administration order was reversed. For the other half of the animals, the sequence of drug and vehicle conditioning sessions was counterbalanced. A total of six conditioning sessions (3 with drug and 3 with vehicle) were conducted. During the last phase, the post-test, animals were allowed again free access to both compartments for 15 min and this session was videorecorded. The apparatus was carefully cleaned between sessions. The rewarding effect was determined with a CPP score, obtained by subtracting the time spent in the non-preferred compartment during the pre-test, from the time spent in this same compartment (drug-paired) during the post-test (McKendrick and Graziane 2020). Positive scores indicate the establishment of a CPP.

Tissue sample processing

Twenty-four hours after the end of the experiments, animals were deeply anesthetized, their brains removed in less than 2 min and stored at − 80 °C until further use. Based on the coordinates of a rat stereotaxic atlas (Paxinos and Watson 2009), coronal slices (150 µm) of the region containing the striatum (2.52 to 0.84 mm relative to bregma) were obtained using a cryostat (− 23 °C; Hyrax C25, Zeiss, Waldorf, Germany). Samples of NAc shell, NAc core, and CPu were collected from both hemispheres in each slice, with the aid of sample corers (0.75, 1, and 3 mm; Fine Science Tools Inc., Foster City, CA, USA). Samples were homogenized in a buffer containing 250 mM sucrose (Sigma-Aldrich, cat. S-0389), 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich, cat. EDS), 10 mM Tris (Bio-Rad, cat. 1610716) pH 7.2, supplemented with a protease inhibitor cocktail (Thermo Fisher, cat. 78430); the buffer was added to NAc core and shell samples (100 µl) and to CPu (300 µl) samples. Tissues were emulsified with a Teflon-type pestle (Thomas Scientific, cat. 3432N55, Swedesboro, NJ, USA), adapted to a tissue homogenizer (BioSpec Products Inc., cat. 985370 Bartlesville, OK, USA), with 10 pulses, 5000 rpm, at 4 °C. The homogenates were centrifuged (3000 × g 15 min, 4 °C; Z233 MK2 Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Germany) and supernatants were transferred for a second centrifugation (14,000 × g 30 min, 4 °C). The resulting supernatants were reserved for protein determinations. Protein concentration on each sample was determined with a DC protein assay kit (Bio-Rad, cat. 5000116) and a spectrophotometer (wavelength of 750 nm; Epoch Biotek-Instrument, Winooski, VT, USA). Calculations were done to load 22.5 µg of protein from each sample per gel lane.

Western blot

The molecular weight (MW) standards (Bio-Rad, cat.1610376) and protein samples were diluted with Laemmli buffer (Sigma-Aldrich, cat. S3401), and each sample was supplemented with 35% 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, cat. M7522). Samples for DAT determinations were boiled for 1 min, whereas samples for D1R and D2R determinations were boiled for 5 min. Denatured protein samples were separated on a discontinuous (4–7.5%) SDS–polyacrylamide gel (for 2.5 h, 90 mV; Mini-protean Tetra chamber, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Proteins were electrophoretically transferred (1 h, 100 mV) from

gels to nitrocellulose membranes (0.45 µm; Santa Cruz, cat. SC201706). Blotted membranes were rinsed with 10 mM sodium phosphate buffer (PBS) with 0.09% NaCl (1×, 10 min) and blocked with the PBS buffer containing 0.3% Tween-20 (Bio-Rad, cat 1706531), 3% teleostean gelatin (Sigma-Aldrich, cat. G7765), and 0.1–0.12% nonfat milk (0.1% for D1R detection; 0.11% for D2R and actin; 0.12% for DAT, 60 min; Bio-Rad, cat. 1706404). Membrane blots were incubated overnight at 4 °C with mouse anti-D1R (Santa Cruz, cat. sc33660, diluted 1:300), rabbit anti-D2R, (Millipore, cat AB5084P, diluted 1:1500), rabbit anti-DAT (Sigma-Aldrich, cat. D6944, diluted 1:1600), and goat anti-β-Actin, (Santa Cruz, cat. SC1616, diluted 1:7500) in the blocking solution. After washing with the gelatin/Tween-20/PBS solution (4×, 10 min), the membranes were incubated with the blocking solution and secondary antibodies: HRP donkey anti-mouse (cat. 115–035-003, diluted 1:1000 for D1R determination), HRP donkey anti-rabbit (cat. 711–035-152, diluted 1:9000 for D2R determination and 1:12000 for DAT determination), and HRP donkey anti-goat (cat. 705–036-147, diluted 1:5000), all purchased from Jackson ImmunoResearch. The MW standard was incubated with StrepTactin (Bio-Rad, cat. 161–0380, diluted 1:90000). Membranes were washed with 0.1% Tween-20/PBS (4×, 10 min) followed by PBS washes (2×, 5 min) and incubated with an enhanced chemiluminescence kit (Bio-Rad, cat.170–5061). Antibodies bound to membranes were visualized on X-ray blue films (Carestream Health Inc., cat. 6041222, Windsor, CO, USA). The relative optical densities (O.D) of bands were analyzed with the Image Studio Lite 5.2.5 software (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). Densities were normalized against actin and the results were expressed in arbitrary units.

MW and O.D. of the labeled protein bands were determined by an examiner who was not aware of the treatment group from which the tissue was obtained.

Statistical analyses

A one-way analysis of variance (ANOVA) test was used to compare three independent groups. Two-way ANOVAs were used to compare type of movement, sexual condition, and their interaction (type of movement × sexual condition); or treatment, sexual condition, and their interaction (treatment × sexual condition). Comparisons along time among the different sexual conditions were conducted by means of repeated measures (RM) two-way ANOVA. The Tukey multiple comparisons test was used for post hoc analyses. We considered P-values ≤ 0.05 as statistically significant. The Prism 8.2.1 software (GraphPad, San Diego, USA) was employed for all statistical analyses. Data are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM).

Experimental design

Behavioral procedures were always conducted at the same time of the day, during the dark phase of the cycle, under red dim light. We randomly assigned the sexually experienced animals to one of three main groups: rats without recent sexual activity for at least 4 days, which served as the control group (C); animals that ejaculated once 24 h before the behavioral tests (1E); and animals that copulated to satiety the day before the behavioral tests (S–S).

Experiment 1. Effect of sexual condition on Meth-induced locomotor activity

To determine if recent sexual activity affected Meth-induced locomotion, males of each sexual condition were injected with Meth (0.5, 1, 2, 3, or 4 mg/kg) or vehicle 24 h after sexual activity (day 2) and their locomotor activity was recorded for 60 min. On day 3, brains were extracted from the males acutely treated with 3 mg/kg Meth or vehicle ($n = 3$). Western blots for D1R, D2R, and DAT were performed using samples from NAc shell, NAc core and CPu (Fig. 1a).

Experiment 2. Effect of sexual condition on Meth-induced CPP

In this experiment, males were habituated to the CPP apparatus for two consecutive days. Thereafter, on day 1 of the experiment, they performed sexual activity, either 1E or S–S, while C animals remained in their home cage. On days 2 to 4, CPP conditioning sessions were conducted in animals of each sexual condition, alternating Meth (0.03, 0.3, or 3 mg/kg) and vehicle sessions. After one resting day, all males were tested for place preference (Fig. 1b). Non-conditioned (NC) animals of each sexual condition were subjected to the same phases but received vehicle in all sessions. Twenty-four hours after the CPP test, brains from the groups conditioned with 0.3 mg/kg Meth and from their corresponding NC groups ($n = 3$) were obtained for western blot analyses.

Results

Recent sexual activity enhances Meth-induced locomotor effects

Inverted U-shaped dose–response curves were obtained in all groups after Meth administration. In general, 0.5 to 2 mg/kg Meth increased locomotion, whereas higher doses (3 and

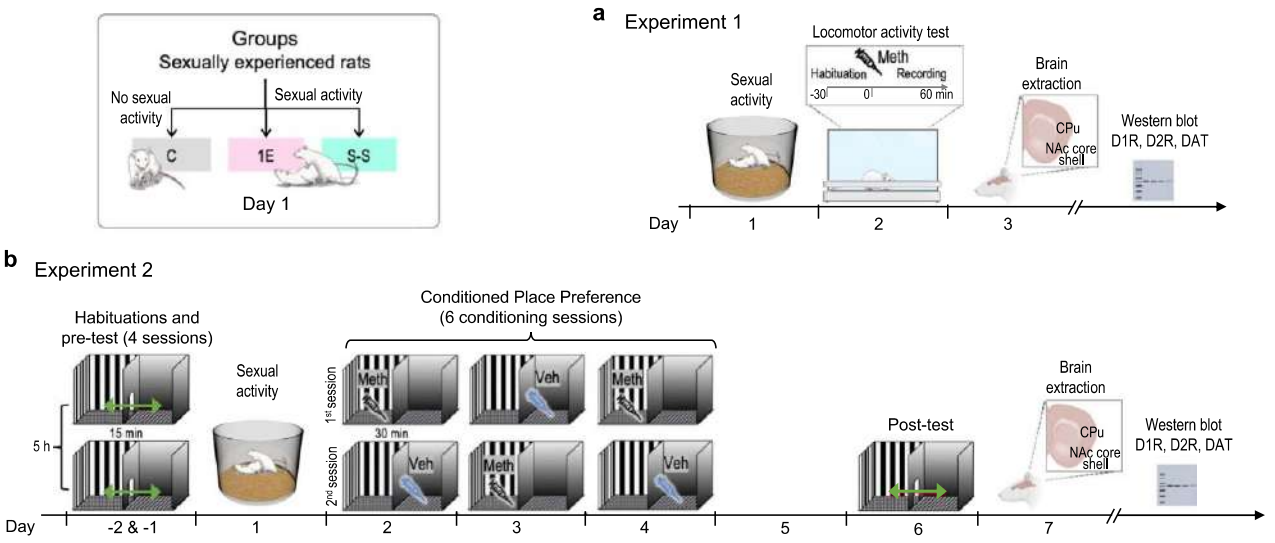

Fig. 1 Experimental design. Sexually experienced male rats were assigned to one of three groups: Control animals (C) that did not copulate, rats that ejaculated once (1E), and males that copulated to satiety (S–S) the day before the experiment. **a** Experiment 1. Independent groups of animals of each sexual condition ($n=8$ each) were i.p. injected with different Meth doses or its vehicle and were tested immediately after for locomotor activity during 60 min. Twenty-four hours later, brains from animals receiving 3 mg/kg Meth or vehicle ($n=3$ each) were dissected for western blot analyses. **b** Experiment 2. Independent groups of males of each sexual condition ($n=8$ each) were tested for conditioned place preference (CPP) in response to different Meth doses or vehicle (Veh) administration to non-conditioned (NC) groups ($n=8$ each) using a biased design. The conditioning phase consisted of 6 sessions, 2 per day, 5 h apart. CPP was evaluated 48 h after the last conditioning session. Twenty-four hours later, brains from animals of each sexual condition, treated with 0.3 mg/kg Meth or vehicle (n=3 each), were extracted for western blot analyses

4 mg/kg) produced smaller effects and induced pronounced stereotyped behavior. In C and 1E rats, maximum locomotion was achieved with 2 mg/kg Meth, while in S–S animals, both 2 and 3 mg/kg produced peak effects (Fig. 2a). The differences among groups were more evident in the time-course graphs (Fig. 2b). In all groups, 2 mg/kg Meth maintained elevated locomotion after reaching peak levels. In C and 1E groups, the 3 mg/kg Meth dose also produced a steady increase in locomotion, though of lower magnitude than that produced by 2 mg/kg. By contrast, in the S–S group, 2 and 3 mg/kg Meth produced a similar effect. The 4 mg/kg Meth dose produced an initial locomotor peak in all groups, which began to decline after 15 min, with marked differences in its magnitude among groups (C < 1E < S–S).

In Fig. 3, we further analyzed the stereotyped behavior induced by 2, 3, and 4 mg/kg Meth. The 2 mg/kg Meth dose produced more locomotor activity than stereotyped movements in C, 1E, and S–S animals; however, Meth produced a higher locomotion in both copulating groups. The locomotor response in the C group was approximately one-third smaller than those observed in 1E and S–S animals along time (Fig. 3, left panels).

After the 3 mg/kg Meth dose, both 1E and S–S rats displayed more locomotor activity than stereotyped movements; by contrast, the C group exhibited a similar amount of both. When comparing locomotor activity among groups, the copulating groups showed significantly larger increases than C males, with S–S rats showing the maximal response. By contrast, stereotyped movements did not differ among groups. Differences in locomotion were also evident throughout the test, with S–S males showing the highest response around 25 min after drug administration. Post hoc analysis showed that locomotion also differed between 1E and S–S animals from minute 12 to 57, with S–S animals showing the highest activity (Fig. 3, middle panels).

The dose of 4 mg/kg Meth produced a similar amount of locomotor activity and stereotyped movements in all groups. Locomotor activity did not differ among groups, but stereotyped movements were higher in 1E as compared to C rats. As to locomotion across time, peak activity lasted longer in 1E and S–S males than in C animals, with S–S rats showing the highest peak effect (Fig. 3, right panels).

Sexual satiety potentiates Meth's rewarding effect

The impact of the different sexual conditions on Meth-induced CPP is shown in Fig. 4. In C rats, all Meth doses produced similar CPP scores, while in the 1E group, only 0.3 mg/kg Meth was effective. In the S–S group, Meth produced CPP at all doses, in an inverted U dose–response

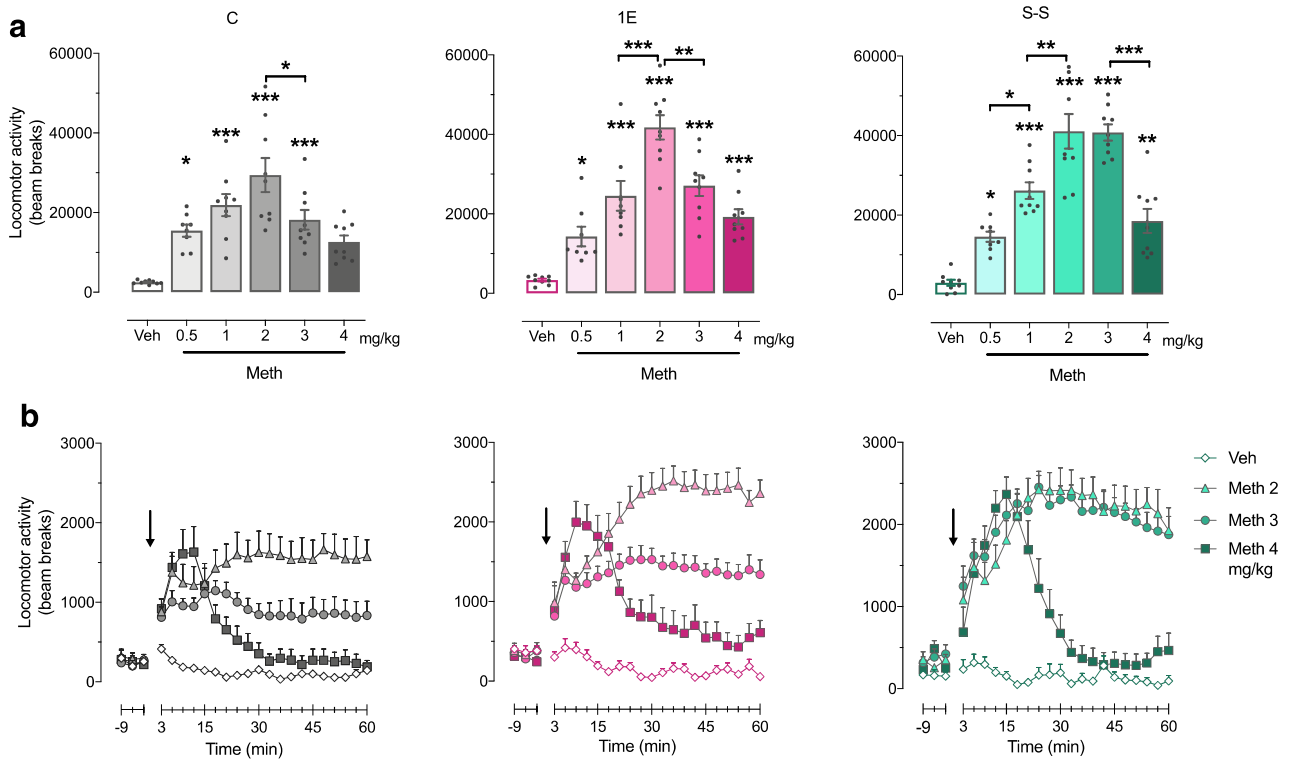

Fig. 2 Meth-induced locomotor effects in animals with different sexual conditions. **a** Dose–response curves of the effect of different doses of Meth (0.5–4 mg/kg, i.p.) or vehicle (Veh) in control (C), one ejaculation (1E), and sexually satiated (S–S) male rats on locomotion along 60 min. Data are expressed as total beam breaks. $^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.01$; $^{***}P<0.001$; Tukey test (one-way ANOVA: C: $F_{(5,\ 47)}=13$, $P<0.001$; 1E: $F_{(5,\ 46)}=27$, $P<0.001$; S–S: $F_{(5,\ 47)}=34$, $P<0.001$). **b** Time courses of the effects of moderate to high Meth doses (2, 3, or 4 mg/kg, i.p.) or vehicle (Veh) on locomotion along 60 min, expressed as beam breaks at 3-min intervals. The arrows indicate drug injection. For clarity, only positive error bars are included in the curves

manner. Thus, the intermediate Meth dose (0.3 mg/kg) produced the highest CPP score, while higher and lower doses produced significantly smaller responses (Fig. 4a). Since 0.3 mg/kg Meth induced CPP in all animals, we compared the effects of this particular dose among groups to emphasize that S–S animals displayed a significantly higher rewarding effect (Fig. 4b).

Striatal dopamine-related proteins are differentially modified by Meth and by sexual activity

Next, we assessed if changes in D1R, D2R, and DAT expression in the striatum of male rats occurred in response to Meth administration, recent sexual activity, and its combination. The antibodies against D1R, D2R, and DAT recognized the following protein bands consistent with the expected MWs: a band of ~50 kDa for the D1R (Almanza et al. 2019); two bands of ~75 and ~100 kDa for the D2R, which may be related to the detection of the two molecular forms of the D2R generated by alternative splicing (Dal Toso et al. 1989) or to D2R post-translational modifications (Stojanovic et al. 2017); and three bands for DAT, one of ~55 kDa corresponding to the protein and the other two ~68 kDa related to post-translational DAT modifications (Luis-Ravelo et al. 2021).

Results of DA-related protein expression are shown in Fig. 5 (acute 3 mg/kg Meth injection) and Fig. 6 (repeated 0.3 mg/kg Meth administration), and their detailed statistical data are included in Tables 1 and 2, respectively.

First, we determined if single or repeated Meth administration, as well as sexual activity, induced changes by themselves in DA-related protein expression in the striatum of male rats. These results are summarized in Table 3. Acute Meth administration to C rats decreased D2R expression only in the NAc shell; in contrast, repeated Meth administration increased DAT expression in the same brain region. Conversely, sexual activity per se produced changes in DA-related proteins in the NAc core and CPu, but not in the NAc shell. In the animals sacrificed 2 days after sexual activity, 1E males showed a reduction in DAT density in the NAc core and in D2R expression in the CPu, while in the S–S rats, DAT density was also decreased in the NAc core, but D1R expression was increased in this striatal region. In addition, a decrease in D2R expression in the CPu was found.

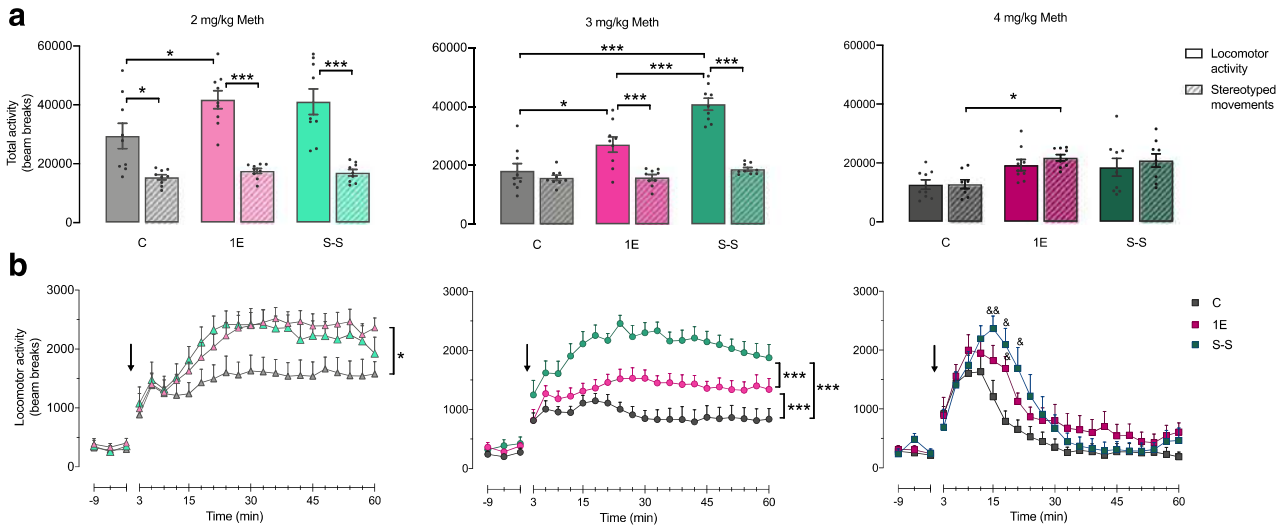

Fig. 3 Meth-induced locomotion and stereotyped movements in animals with different sexual conditions. **a** Comparison of total locomotor activity (solid bars) and stereotyped movements (dashed bars) produced by 2, 3, and 4 mg/kg Meth in control (C), one ejaculation (1E), and sexually satiated (S–S) animals. $^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.01$; $^{***}P<0.001$; Tukey test (2 mg/kg two-way ANOVA: $F_{(2,\ 48)}=3.8$, $P=0.027$, for sexual condition; $F_{(1,\ 48)}=78.5$, $P<0.001$, for type of movement; and $F_{(2,\ 48)}=2.09$, $P=0.13$, for interaction; 3 mg/kg two-way ANOVA: $F_{(2,\ 48)}=26.2$, $P<0.001$, for sexual condition; $F_{(1,\ 48)}=65.8$, $P<0.001$, for type of movement; and $F_{(2,\ 48)}=15.1$, $P<0.001$, for interaction; 4 mg/kg two-way ANOVA: $F_{(2,\ 47)}=8.8$, $P<0.001$ for sexual condition; $F_{(1,\ 47)}=0.98$, $P=0.33$ for type of movement; $F_{(2,\ 47)}=0.2$, $P=0.82$ for interaction). **b** Left panel: time course of locomotor activity produced by 2 mg/kg Meth, expressed as beam breaks at 3-min intervals. The arrows indicate the time of injection. $^{*}P<0.05$; Tukey test (two-way RM ANOVA: $F_{(2,\ 24)}=3.08$, $P=0.064$, for sexual condition; $F_{(4.5,\ 108)}=25.9$, $P<0.001$, for time; and $F_{(38,\ 456)}=2.32$, $P<0.001$, for interaction). Middle panel: time course of locomotor activity produced by 3 mg/kg Meth, expressed as beam breaks at 3-min intervals. The arrows indicate the time of injection. $^{***}P<0.001$; Tukey test (two-way RM ANOVA: $F_{(2,\ 24)}=23$, $P<0.001$, for sexual condition; $F_{(3.4,\ 82)}=4.9$, $P=0.002$, for time; and $F_{(38,\ 456)}=1.7$, $P=0.007$, for interaction). Right panel: time course of locomotor activity produced by 4 mg/kg Meth, expressed as beam breaks at 3-min intervals. The arrows indicate the time of injection. $^{\&}P<0.01$; $^{\&\&}P<0.01$; Tukey test (two-way RM ANOVA: $F_{(2,\ 24)}=2.6$, $P<0.098$ for sexual condition; $F_{(2.4,\ 58)}=31$, $P<0.001$ for time; and $F_{(38,\ 456)}=1.8$, $P=0.004$ for interaction)

In animals sacrificed 6 days after 1E, DAT was increased in the CPu, while in S–S animals, the DAT decrease in the NAc core persisted.

Acute and repeated Meth treatment produced differential effects on DA-related protein expression depending on the sexual condition of the animals

We also determined the effects of single or repeated Meth administration on D1R, D2R, and DAT expression in the striatum of male rats with different sexual conditions. These results are shown in Figs. 5 and 6 and summarized in Table 4. Meth acute treatment increased D2R expression in the NAc shell of 1E and S–S rats, which was more pronounced in S–S animals, contrary to the decreased D2R density produced in C rats. Acute Meth also decreased D1R expression in the CPu of S–S rats. By contrast, repeated Meth administration decreased to a similar extent DAT and D1R expression in the NAc shell of 1E and S–S animals, in contrast to the increase in DAT density produced in C males in this striatal region. In S–S animals, repeated Meth treatment also reduced D1R expression in the NAc core and D2R density in the CPu.

Discussion

The hypothesis of this work was twofold. First, changes in the ML-DA circuit of S–S male rats would modify Meth-induced motor and rewarding effects, and second, changes in DA receptors and DAT levels in the different striatal regions would accompany those modifications. In line with the hypothesis, our results show that Meth's locomotor and rewarding effects were exacerbated in S–S animals, while in 1E males, only the locomotor effects were enhanced, and this to a lower extent. Besides, sexual activity, by itself, modified DA-related protein expression in the NAc core and CPu, while Meth treatment, alone, induced changes in their expression only in the NAc shell. When animals displayed sexual activity, Meth administration induced changes in DA-related protein expression in the NAc shell that were opposite to those observed in C males and induced additional

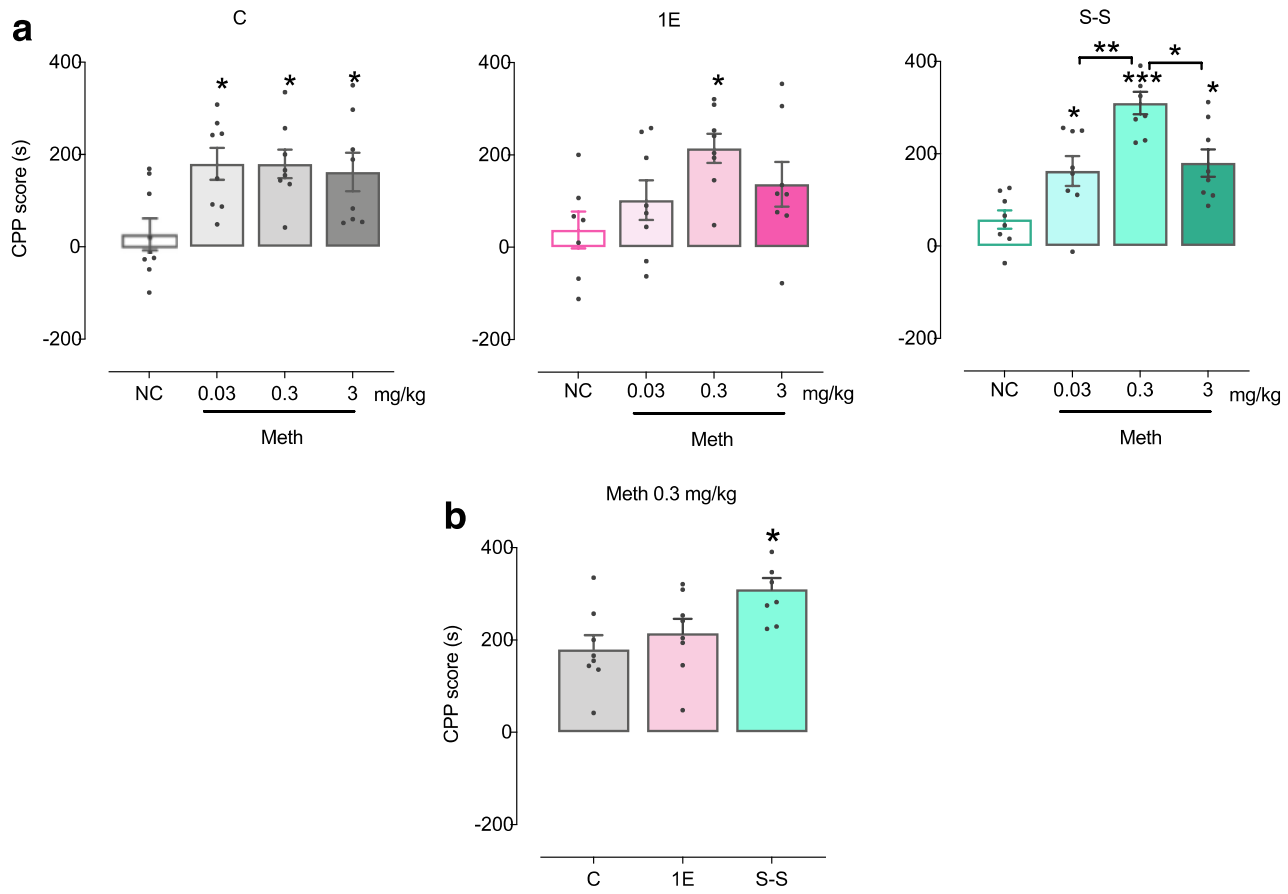

Fig. 4 Meth-induced CPP in animals with different sexual conditions. **a** All doses of Meth (0.03–3 mg/kg) produced similar CPP scores in control (C) rats as compared with non-conditioned (NC) animals. $^{*}P<0.05$; Tukey test (one-way ANOVA: $F_{(3,\ 29)}=4.6$, $P=0.009$). Meth-induced CPP in rats that ejaculated once (1E) but only at the 0.3 mg/kg dose. $^{*}P<0.05$; Tukey test (one-way ANOVA: $F_{(3,\ 27)}=3.1$, $P=0.04$;). In sexually satiated (S–S) animals, Meth-induced CPP at all doses with an inverted U-shaped dose–response profile. $^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.01$; $^{***}P<0.001$; Tukey test (one-way ANOVA: $F_{(3,\ 28)}=15$, $P<0.001$). **b** Comparison of CPP scores produced by 0.3 mg/kg Meth in control (C), one ejaculation (1E), and sexually satiated (S–S) rats. $^{*}P<0.05$; Tukey test (one-way ANOVA: $F_{(2,\ 21)}=5.4$, $P=0.013$)

changes in the NAc core and CPu of S–S rats, but not of 1E animals.

Sexual activity sensitizes animals to Meth's motor effects

We observed that sexual activity sensitized male rats to Meth-induced hyperlocomotion. All Meth doses tested produced hyperlocomotion in all groups; although this effect was significantly higher in the 1E and S–S animals than in C rats. Thus, sensitization to Meth-induced locomotor response occurs in sexually experienced males regardless of sexual activity display. In line with this result, it has been reported that sexually experienced, but not sexually naïve female and male rodents, exhibit sensitized locomotor responses to amphetamine (Bradley and Meisel 2001; Pitchers et al. 2010). The finding that the sensitized locomotor response was larger in 1E males and exacerbated in S–S animals as compared to C rats suggests that the amount of sexual activity displayed impacted this sensitization. Supporting this interpretation, S–S animals showed maximal hyperlocomotion and had a broader window for peak effects, which were also longer-lasting than those of C and 1E males.

Meth-induced stereotypies have been reported to appear with moderate to high Meth doses (3–7 mg/kg) (Balsara et al. 1979; Ito et al. 1997; Gentry et al. 2004; Pritchard et al. 2012). In keeping with these data, in the present work, the higher Meth doses tested (3 and 4 mg/kg) induced stereotyped movements which, in contrast to the large differences observed in locomotion, did not differ among groups suggesting that sexual activity does not modify this response.

Specific striatal regions differentially regulate amphetamines' motor effects in rodents. Thus, microinjection of D-amphetamine into the NAc but not into the CPu increases

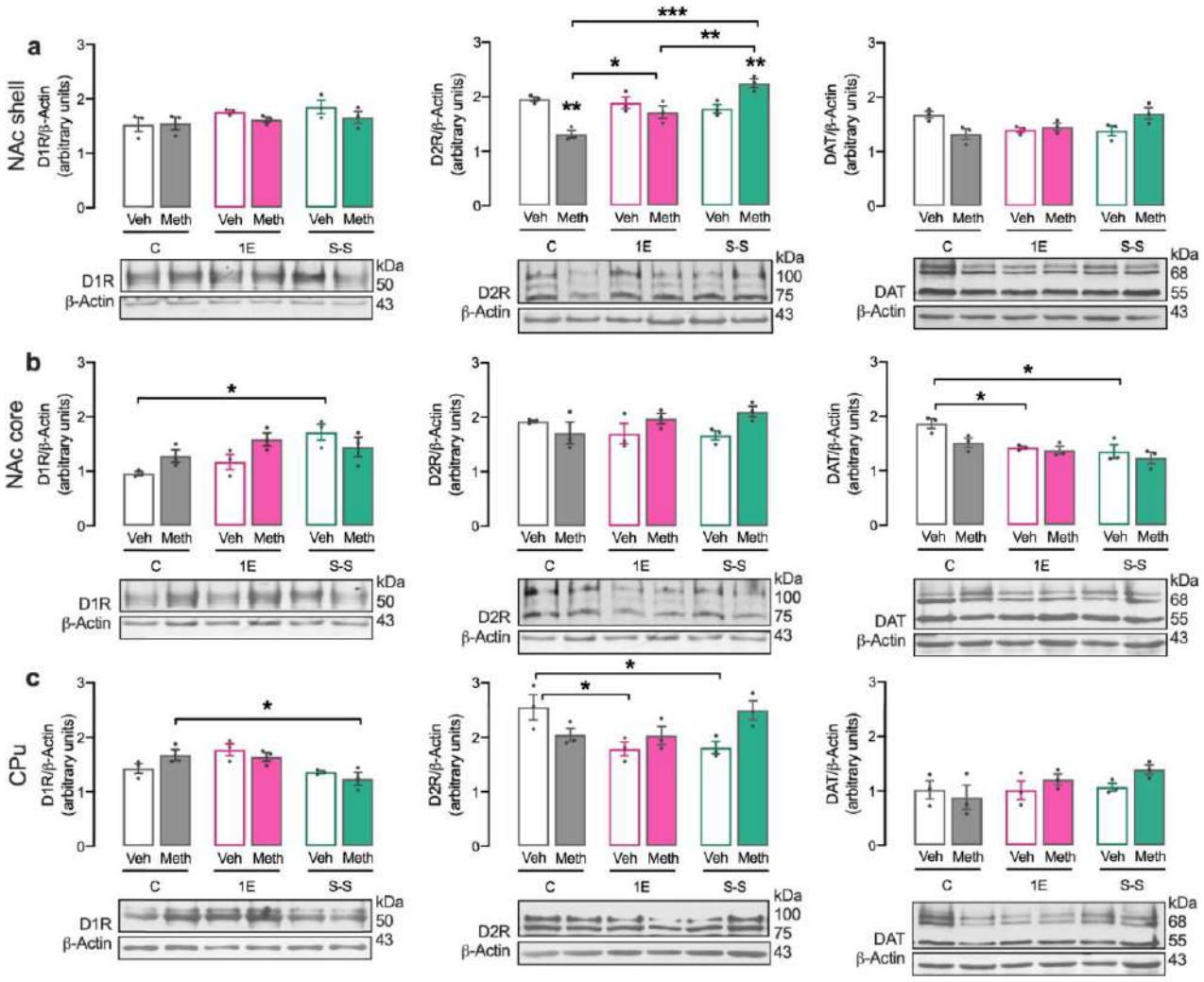

Fig. 5 Effect of acute Meth administration and sexual condition on DA-related protein expression in striatal regions of male rats. D1 dopamine receptor (D1R), D2 dopamine receptor (D2R), and dopamine transporter (DAT) expression in **a** the nucleus accumbens shell (NAc shell), **b** the nucleus accumbens core (NAc core), and **c** the caudate-putamen nucleus (CPu) of control (C), one ejaculation (1E), and sexually satiated (S–S) rats, determined 24 h after Meth (3 mg/kg) or vehicle (Veh) administration and 2 days after sexual activity. Data are expressed as protein/β-Actin optical density (O.D.) ratios of 3 rats per group, in arbitrary units. Representative blots are presented below graphs. $^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.01$; $^{***}P<0.001$; Tukey test (two-way ANOVAs results are shown in Table 1)

locomotor activity, while its administration into the CPu but not the NAc produces stereotypies (Staton and Solomon 1984). This dichotomy is maintained for other DA receptor agonists (Costall et al. 1977). As we observed that Meth-induced hyperlocomotion, but not stereotypies, was affected by the sexual condition, we considered relevant to analyze if 1E and S–S rats basally expressed different levels of DA-related proteins in the striatum.

Sexual satiety potentiates Meth's rewarding effect

As to rewarding effects, the lowest and highest Meth doses tested induced a CPP of similar magnitude in C and S–S males, but not in 1E rats. By contrast, the intermediate Meth dose (0.3 mg/kg) was effective in all groups, although S–S rats exhibited a significantly higher CPP score than C. Several studies report that doses between 1 and 3 mg/kg Meth consistently produce CPP, but lower doses (0.1–0.5) normally do not (Schindler et al. 2002; Gehrke et al. 2003; Khanegheini et al. 2021) or require a more extended conditioning phase to induce it (8–10 conditioning sessions) (Gehrke et al. 2006; Zakharova et al. 2009; Hofford et al. 2014). In the present study, all groups developed a CPP to a low Meth dose after 6 conditioning sessions, evidencing a sensitized response to Meth's rewarding effects. These sensitized responses cannot be

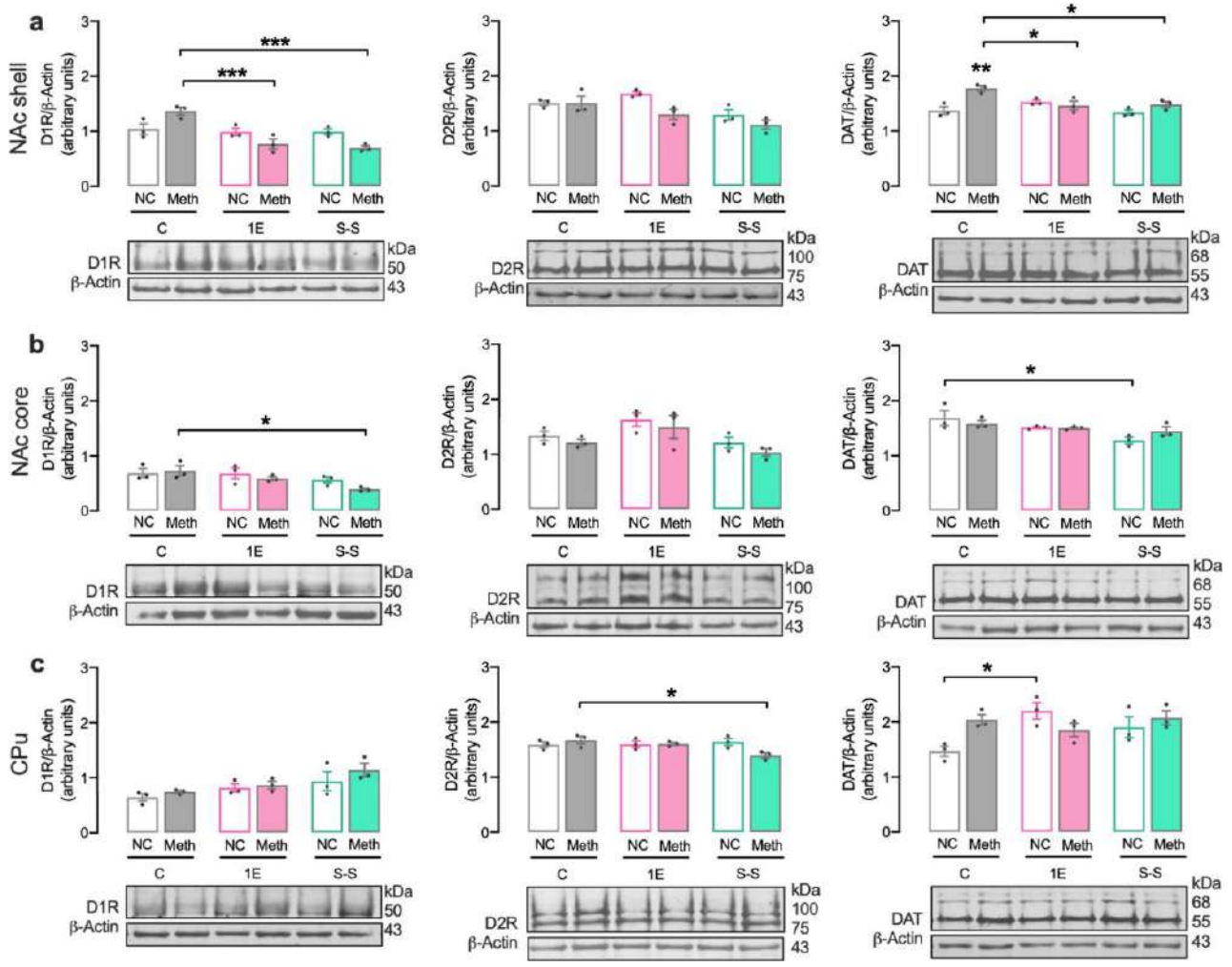

Fig. 6 Effect of repeated Meth administration and sexual condition on DA-related protein expression in striatal regions of male rats. D1 dopamine receptor (D1R), D2 dopamine receptor (D2R), and dopamine transporter (DAT) expression in **a** the nucleus accumbens shell (NAc shell), **b** the nucleus accumbens core (NAc core), and **c** the caudate-putamen nucleus (CPu) of control (C), one ejaculation (1E), and sexually satiated (S–S) rats, conditioned to Meth (0.3 mg/kg × 3) or non-conditioned (NC; vehicle) determined 72 h after the end of treatment and 6 days after sexual activity. Data are expressed as protein/β-Actin optical density (O.D.) ratios of 3 rats per group, in arbitrary units. Representative blots are presented below graphs. $^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.01$; $^{***}P<0.001$; Tukey test (two-way ANOVAs results are shown in Table 2)

Table 1 Two-way ANOVA parameters corresponding to Fig. 5

		Meth (3 mg/kg)	Sexual condition	Meth × sexual condition
NAc shell	D1R	$F_{(1,12)}=1.7$; $P=0.22$	$F_{(2,12)}=2.5$; $P=0.13$	$F_{(2,12)}=0.62$; $P=0.55$
	D2R	$F_{(1,12)}=2.75$; $P=0.123$	$F_{(2,12)}=9.69$; $P=0.003$	$F_{(2,12)}=20.9$; $P<0.001$
	DAT	$F_{(1,12)}=0.01$; $P=0.92$	$F_{(2,12)}=0.98$; $P=0.403$	$F_{(2,12)}=8.53$; $P=0.005$
NAc core	D1R	$F_{(1,12)}=2.1$; $P=0.175$	$F_{(2,12)}=6.3$; $P=0.013$	$F_{(2,12)}=4.1$; $P=0.044$
	D2R	$F_{(1,12)}=2.4$; $P=0.15$	$F_{(2,12)}=0.15$; $P=0.87$	$F_{(2,12)}=3.4$; $P=0.069$
	DAT	$F_{(1,12)}=5.6$; $P=0.036$	$F_{(2,12)}=11$; $P=0.002$	$F_{(2,12)}=1.6$; $P=0.24$
CPu	D1R	$F_{(1,12)}=0.07$; $P=0.796$	$F_{(2,12)}=11$; $P=0.002$	$F_{(2,12)}=2.3$; $P=0.15$
	D2R	$F_{(1,12)}=2.7$; $P=0.12$	$F_{(2,12)}=1.5$; $P=0.25$	$F_{(2,12)}=8.1$; $P=0.006$
	DAT	$F_{(1,12)}=1.1$; $P=0.31$	$F_{(2,12)}=1.8$; $P=0.208$	$F_{(2,12)}=1.3$; $P=0.31$

Table 2 Two-way ANOVA parameters corresponding to Fig. 6

		Meth (3 × 0.3 mg/kg)	Sexual condition	Meth × sexual condition
NAc shell	D1R	$F_{(1,12)}=1.1$; $P=0.32$	$F_{(2,12)}=15$; $P<0.001$	$F_{(2,12)}=11$; $P=0.002$
	D2R	$F_{(1,12)}=7.1$; $P=0.021$	$F_{(2,12)}=8$; $P=0.006$	$F_{(2,12)}=2.5$; $P=0.12$
	DAT	$F_{(1,12)}=9.2$; $P=0.010$	$F_{(2,12)}=3.7$; $P=0.055$	$F_{(2,12)}=8.8$; $P=0.004$
NAc core	D1R	$F_{(1,12)}=1.8$; $P=0.21$	$F_{(2,12)}=5.9$; $P=0.017$	$F_{(2,12)}=1.2$; $P=0.33$
	D2R	$F_{(1,12)}=2.3$; $P=0.16$	$F_{(2,12)}=7.1$; $P=0.009$	$F_{(2,12)}=0.031$; $P=0.97$
	DAT	$F_{(1,12)}=0.11$; $P=0.74$	$F_{(2,12)}=7$; $P=0.01$	$F_{(2,12)}=1.8$; $P=0.21$
CPu	D1R	$F_{(1,12)}=2.1$; $P=0.17$	$F_{(2,12)}=6.1$; $P=0.015$	$F_{(2,12)}=0.31$; $P=0.74$
	D2R	$F_{(1, 12)}=1.3$; $P=0.27$	$F_{(2,12)}=2.3$; $P=0.14$	$F_{(2,12)}=4.9$; $P=0.028$
	DAT	$F_{(1, 12)}=1.5$; $P=0.24$	$F_{(2,12)}=2.5$; $P=0.12$	$F_{(2,12)}=6$; $P=0.016$

Table 3 Changes in striatal D1R, D2R, and DAT densities produced by acute and repeated Meth administration or by sexual activity

	Acute Meth (3 mg/kg)	Repeated Meth (3 × 0.3 mg/kg)	Sexual activity −2 days		Sexual activity −6 days	
Striatal region	C	C	1E	S–S	1E	S–S
NAc shell	↓↓D2R	↑↑ DAT	_	_	_	_
NAc core	_	_	↓DAT	↓DAT ↑D1R	_	↓DAT
CPu	_	_	↓D2R	↓D2R	↑DAT	_

C = control animals without recent sexual activity; 1E = animals that ejaculated once; S–S = animals that copulated to satiety; ↓ reduced expression; ↑ increased expression; *Meth*, methamphetamine; *NAc*, nucleus accumbens; *CPu*, caudate-putamen; *DAT*, dopamine transporter; *D1R*, D1 dopamine receptor; *D2R*, D2 dopamine receptor

Table 4 Changes in striatal D1R, D2R, and DAT densities produced by acute or repeated Meth administration to animals with different sexual conditions

	Acute Meth (3 mg/kg)			Repeated Meth (3 × 0.3 mg/kg)		
Striatal region	C	1E	S–S	C	1E	S–S
NAc shell	↓↓D2R	↑D2R	↑↑↑D2R	↑↑ DAT	↓DAT, ↓↓↓D1R	↓DAT, ↓↓↓D1R
NAc core	_	_	_	_	_	↓D1R
CPu	_	_	↓D1R	_	_	↓D2R

C = control animals without recent sexual activity; 1E = animals that ejaculated once; S–S = animals that copulated to satiety; ↓ reduced expression; ↑ increased expression; *Meth*, methamphetamine; *NAc*, nucleus accumbens; *CPu*, caudate-putamen; *DAT*, dopamine transporter; *D1R*, D1 dopamine receptor; *D2R*, D2 dopamine receptor

attributed only to sexual activity, because C animals were sexually experienced but did not copulate for 4–5 days before Meth administration. In line with this result, it has been reported that sexual experience in male rats enhances the CPP induced by amphetamine, but only after a sexual behavior abstinence period of 10 days. The authors attributed the rewarding sensitization to morphological changes in the NAc core and shell that require several days after sexual stimulation to appear (Pitchers et al. 2010). This could explain why C animals, who had 4–5 days of sexual inactivity prior to habituation to the CPP apparatus, plus the 3 days that elapsed before the beginning of the conditioning sessions, developed CPP to low Meth doses.

Rats of the 1E condition did not develop a CPP to the lowest Meth dose, but they did in response to the intermediate dose (0.3 mg/kg), which is still in the range of low Meth doses normally not producing CPP. Thus, they also showed a sensitized response to Meth's rewarding effect, but only at this specific dose. Interestingly, S–S animals who ejaculated repeatedly the day before beginning Meth's conditioning sessions showed the highest sensitized rewarding response. This enhanced Meth-induced CPP cannot be linked to a period of sexual behavior abstinence; however, it could be related to the changes in ML-DA circuit functioning associated with its intense stimulation by copulation to satiety (see below).

The hyperresponsiveness of S–S rats to Meth's locomotor and rewarding effects agrees with the generalized hypersensitivity to drug actions characteristic of S–S animals. This phenomenon has been consistently observed

24 h after copulation to satiety and remains present during 72 h (Rodríguez-Manzo et al. 2011; González-Morales and Rodríguez-Manzo 2020) evidencing the long-term nature of the effects produced by intense sexual activity in a short period. Present data add sensitization to Meth-induced behavioral effects to the list of long-term effects resulting from sexual activity to satiety. We have demonstrated that endocannabinoids, released during copulation to satiety and involved in the induction of changes in glutamate ionotropic receptor composition at the VTA, participate in the hypersensitivity to drug actions of S–S rats (Rodríguez-Manzo 2015; González-Morales and Rodríguez-Manzo 2020; Rodríguez-Manzo et al. 2021). The glutamate receptors' subunit composition changes found in sexually satiated males were consistent with a specific long-term plasticity phenomenon, i.e., long-term depression (LTD) (Rodríguez-Manzo et al. 2021) that could also contribute to the sensitized responses of S–S rats to Meth-induced effects, but specific experiments are needed to test this hypothesis.

In addition to the above-mentioned changes, our group has recently found that 24 h after sexual satiety, there is a significant decrease in NAc DA basal levels of S–S rats that does not occur in animals that ejaculated only once the day before (Canseco-Alba et al. 2022). Thus, the S–S group had a decreased dopaminergic tone in the NAc at the beginning of Meth administration, which could be related to the sensitized behavioral effects observed here. In support of this idea, there are reports showing that psychostimulants produce an exacerbated locomotor activity (Stromberg and Mackler 2005) and sensitized rewarding effects in the CPP of high-ethanol consuming animals as compared to low-ethanol consumers (Fahlke et al. 1995). These results are relevant because Ericson and coworkers recently found that high-ethanol preferring animals have a hypodopaminergic tone in the NAc (Ericson et al. 2019).

Meth treatment and sexual activity differentially modify DA-related proteins in the striatum

It has been reported that the behavioral effects produced by amphetamine are independent processes that are modulated by different accumbal subregions; the NAc shell contributes to its rewarding effects and the NAc core to hyperlocomotion (Carr et al. 1988; Boye et al. 2001; Sellings and Clarke 2003). Therefore, we considered relevant to analyze the changes in DA-related proteins in the different striatal regions produced by sexual activity and Meth, by themselves or combined.

Effects of Meth treatment

Meth administered to C rats induced changes in DA-related protein expression only in the NAc shell. Thus, acute Meth reduced D2R expression, while repeated Meth administration increased DAT levels in the same striatal region. Few reports have associated the effects of relatively low Meth doses (as the ones used in this study) with striatal DA-related protein changes. Of those, one reported that subchronic administration (10 days) of 2 mg/kg Meth increased DAT immunoreactivity in the NAc, but not in the striatum (CPu) of rats, 24 h after the last Meth administration (Broom and Yamamoto 2005). These results suggest that psychostimulant drugs, even at low doses, modify DA-related proteins in the NAc of animals sensitized to DA stimulation due to sexual experience. Similar to what we found, a decrease in D2R immunoreactivity has been found in rat striatal (CPu) synaptosomes after acute Meth administration, although at a dose higher than the one used in the present study (6 mg/kg instead of 3 mg/kg) (Chauhan et al. 2014).

Effects of sexual activity

In contrast to Meth, the changes in DA-related protein expression induced by sexual activity were confined to the NAc core and the CPu. Two days after sexual activity, DAT density was decreased in the NAc core and D2R expression was diminished in the CPu of both copulating groups, while D1R expression increased in the NAc core, but only in S–S animals. When animals were euthanized 6 days after sexual activity, only the decrease in NAc core DAT density of S–S males persisted.

The occurrence of sexual activity–associated changes in DA-related proteins in the NAc core agrees with the key role played by this striatal subregion in mediating responses to motivational stimuli (Corbit et al. 2001; Berridge and Kringelbach 2015; Dai et al. 2022). On the other hand, the changes observed in the CPu are in line with its activation during copulation (Pfaus et al. 1990; Damsma et al. 1992) and other natural motivated behaviors (Palmiter 2008; Li and Jasanoff 2020). To our knowledge, this is the first study relating DA-related protein changes with sexual activity in sexually experienced male rats. Therefore, we can only hypothesize that the decrease in DAT in the NAc core and D2R expression in the CPu found in both copulating groups results from sexual activity display, independently of its intensity. By contrast, D1Rs were upregulated, but only in the NAc core of S–S rats. This result might be related to the intense sexual activity, triggering neuroplastic changes in these animals (Garduño-Gutiérrez et al. 2013; González-Morales and Rodríguez-Manzo 2020; Rodríguez-Manzo et al. 2021).

The changes observed in DA receptors due to sexual activity were transient because they disappeared after 6 days. Only the decreased DAT expression in the NAc core persisted in S–S animals, suggesting that an intense DA uptake took place in these rats. At this moment, we do not have an explanation for the increase in DAT in the CPu that emerged in 1E animals after 6 days. This finding warrants further investigation.

It has been evidenced that striatal D1R activation and D2R blockade favor psychostimulant-induced hyperlocomotion and rewarding effects (Baik 2013; Salery et al. 2020), whereas a reduced DAT expression enhances cocaine-induced locomotor effect (Tilley et al. 2007). Thus, it would be tempting to correlate the decrease in D2R and DAT density in the CPu of both copulating groups and the increased D1R levels in the NAc core of S–S males with the observed sensitized responses to Meth. However, specific experiments directed to establish such a correlation have to be conducted, in which the timing of the molecular determinations and behavioral tests coincide, to be able to draw such a connection.

Sexual activity modifies Meth-induced adaptations

There are no reports relating the effects of psychostimulants and DA-related proteins in animals with different sexual conditions. Here, we found that Meth produced opposite effects on D2R and DAT expression and induced new ones in D1R in the NAc shell of animals that displayed sexual activity. Moreover, in S–S animals, acute Meth changed D1R expression in the CPu, while repeated Meth induced changes in the NAc core and CPu (in D1R and D2R expression, respectively). These results show, for the first time, that high-intensity sexual stimulation favors Meth-induced adaptations in extended striatal regions.

Our results further support the notion of cross-sensitization between psychostimulants and male sexual activity, which was reported in a study analyzing this interaction with the opposite viewpoint, i.e., the effect of D-amphetamine-induced sensitization on sexual behavior acquisition (Fiorino and Phillips 1999). Although it would be of interest to establish if a similar sensitization to psychostimulant-induced effects is produced by intense sexual activity in female rats, at present there are no reports relating alterations in mesolimbic dopamine neuron functioning produced by female sexual activity.

Taken together, our results provide additional evidence that psychostimulant use leads to adaptations in the striatum (Sun et al. 2003; German et al. 2012; Ashok et al. 2017), which could be different from those produced by natural rewards (Berridge and Kringelbach 2015; Nall et al. 2021). Moreover, we demonstrate that intense sexual activity during copulation to satiety alters Meth effects, showing that significant interactions between natural and chemical stimuli can occur at the ML-DA.

Conclusion

This study shows that different amounts of sexual activity differentially impact Meth-induced rewarding actions and locomotor activity and that copulation to satiety enhances both effects. We also demonstrate that drug and sexual stimulation produce differential changes in striatal D1R, D2R, or DAT expression (Meth modifies DA-related proteins in the NAc shell, while sexual activity does so in the NAc core and CPu). These results might reflect that each stimulus recruits different types of neurons on specific striatal subregions. Notwithstanding, sexual activity modifies the acute and repeated Meth-induced changes in DA-related proteins in the NAc shell and copulation to satiety extends Meth-induced adaptations to other striatal regions. Our findings provide further evidence that a natural rewarding stimulus can modify the effects of psychostimulants at behavioral and molecular levels, evidencing cross-sensitization between stimulant drugs and sexual activity effects.

Acknowledgements The data here reported are part of the PhD dissertation of VV-S, who received a doctoral fellowship (CONACYT grant 704472). We wish to thank Dr. René Garduño-Gutiérrez for technical guidance during western blot experiments, MSc. Araceli Hernández-Mendoza for technical support, and Mrs. Ángeles Ceja Gálvez for animal care.

Author contribution VV-S conducted the experiments and wrote the first draft of the manuscript. GR-M and SLC designed the study. All authors discussed the results and accepted the final version of the manuscript.

Funding This study was funded by the Mexican Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) grants to GR-M (No. 220772).

Data availability Raw data will be provided upon request.

Declarations

Ethics approval We declare that we have complied with the ethical principles regarding the welfare of animals in the conduction of this research. Our Institutional Committee for the Care and Use of Laboratory Animals (Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, CICUAL) approved all experimental procedures (protocol 0230–16), which complied with the regulations established in the Mexican Official Norm for the use and care of laboratory animals (NOM-062-ZOO-1999).

Consent for publication Not applicable.

Conflict of interest The authors declares no competing interests.

References

Almanza A, Segura-Chama P, León-Olea M et al (2019) Cellular mechanism for specific mechanical antinociception by D2-like receptor at the spinal cord level. Neuroscience 417:81–94. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.08.019

Ashok AH, Mizuno Y, Volkow ND, Howes OD (2017) Association of stimulant use with dopaminergic alterations in users of cocaine, amphetamine, or methamphetamine a systematic review and meta-analysis. JAMA Psychiat 74:511–519. https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2017.0135

Baik J-H (2013) Dopamine signaling in reward-related behaviors. Front Neural Circuits 7:1–16. https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00152

Balsara JJ, Jadhav JH, Muley MP, Chandorkar AG (1979) Effect of drugs influencing central serotonergic mechanisms on methamphetamine-induced stereotyped behavior in the rat. Psychopharmacol 64:303–307. https://doi.org/10.1007/BF00427514

Bardo MT (2013) The mesolimbic dopamine reward system and drug addiction. In: Miller PM (ed) Biological research on addiction. Academic Press, pp 209–217

Bassareo V, Di Chiara G (1999) Differential responsiveness of dopamine transmission to food-stimuli in nucleus accumbens shell/core compartments. Neuroscience 89:637–641. https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00583-1

Beach FA, Jordan L (1956) Sexual exhaustion and recovery in the male rat. Q J Exp Psychol 8:121–133. https://doi.org/10.1080/17470215608416811

Berridge KC, Kringelbach ML (2015) Pleasure systems in the brain. Neuron 86:646–664. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.018

Bhimani RV, Vik M, Wakabayashi KT et al (2021) Distinct dose-dependent effects of methamphetamine on real-time dopamine transmission in the rat nucleus accumbens and behaviors. J Neurochem 158:865–879. https://doi.org/10.1111/jnc.15470

Boye SM, Grant RJ, Clarke PBS (2001) Disruption of dopaminergic neurotransmission in nucleus accumbens core inhibits the locomotor stimulant effects of nicotine and D-amphetamine in rats. Neuropharmacology 40:792–805. https://doi.org/10.1016/S0028-3908(01)00003-X

Bradley KC, Meisel RL (2001) Sexual behavior induction of c-Fos in the nucleus accumbens and amphetamine-stimulated locomotor activity are sensitized by previous sexual experience in female syrian hamsters. J Neurosci 21:2123–2130. https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-06-02123.2001

Broom SL, Yamamoto BK (2005) Effects of subchronic methamphetamine exposure on basal dopamine and stress-induced dopamine release in the nucleus accumbens shell of rats. Psychopharmacology 181:467–476. https://doi.org/10.1007/s00213-005-0007-6

Butcher SP, Fairbrother IS, Kelly JS, Arbuthnott GW (1988) Amphetamine-induced dopamine release in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. J Neurochem 50:346–355. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1988.tb02919.x

Canseco-Alba A, Coffeen U, Jaimes O et al (2022) The nucleus accumbens dopamine increase, typically triggered by sexual stimuli in male rats, is no longer produced when animals are sexually inhibited due to sexual satiety. Psychopharmacology (Berl) 239:3679–3695. https://doi.org/10.1007/s00213-022-06240-3

Carr GD, Phillips AG, Fibiger HC (1988) Independence of amphetamine reward from locomotor stimulation demonstrated by conditioned place preference. Psychopharmacology 94:221–226. https://doi.org/10.1007/BF00176849

Chauhan H, Killinger BA, Miller C V., Moszczynska A (2014) Single and binge methamphetamine administrations have different effects on the levels of dopamine D2 autoreceptor and dopamine transporter in rat striatum. Int J Mol Sci 15:5884–5906. https://doi.org/10.3390/ijms15045884

Chiu VM, Schenk JO (2012) Mechanism of action of methamphetamine within the catecholamine and serotonin areas of the central nervous system. Curr Drug Abus Rev 5:227–242. https://doi.org/10.2174/1874473711205030227

Conti LH, Segal DS, Kuczenski R (1997) Maintenance of amphetamine induced stereotypy and locomotion requires ongoing dopamine receptor activation. Psychopharmacology 130:183–188. https://doi.org/10.1007/s002130050227

Corbit LH, Muir JL, Balleine BW (2001) The role of the nucleus accumbens in instrumental conditioning: evidence of a functional dissociation between accumbens core and shell. J Neurosci 21:3251–3260. https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-09-03251.2001

Costall B, Naylor RJ, Cannon JG, Lee T (1977) Differentiation of the dopamine mechanisms mediating stereotyped behaviour and hyperactivity in the nucleus accumbens and caudate-putamen. J Pharm Pharmacol 29:337–342. https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1977.tb11331.x

Dai B, Sun F, Tong X et al (2022) Responses and functions of dopamine in nucleus accumbens core during social behaviors. Cell Rep 40:111246. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111246

Dal Toso R, Sommer B, Ewert M et al (1989) The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. EMBO J 8:4025–4034. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08585.x

Damsma G, Pfaus J, Wenkstern D et al (1992) Sexual behaviour increases dopamine transmission in the nucleus accumbens and striatum of male rats: comparison with novelty and locomotion. Behav Neurosci 106:181–191. https://doi.org/10.1037//0735-7044.106.1.181

Di Chiara G, Imperato A (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. Proc Natl Acad Sci 85:5274–5278. https://doi.org/10.1073/pnas.85.14.5274

Egenrieder L, Mitricheva E, Spanagel R, Noori HR (2020) No basal or drug-induced sex differences in striatal dopaminergic levels: a cluster and meta-analysis of rat microdialysis studies. J Neurochem 152:482–492. https://doi.org/10.1111/jnc.14911

Ericson M, Ulenius L, Andrén A, et al. (2019) Different dopamine tone in ethanol high- and low-consuming Wistar rats. Addict Biol 1–9. https://doi.org/10.1111/adb.12761

Fahlke C, Hård E, Eriksson CJP et al (1995) Amphetamine-induced hyperactivity: differences between rats with high or low preference for Alcohol. Alcohol 12:363–367. https://doi.org/10.1016/0741-8329(95)00019-N

Fiorino DF, Phillips AG (1999) Facilitation of sexual behavior in male rats following d-amphetamine-induced behavioral sensitization. Psychopharmacology 142:200–208. https://doi.org/10.1007/s002130050880

Fiorino DF, Coury A, Phillips AG (1997) Dynamic changes in nucleus accumbens dopamine efflux during the coolidge effect in male rats. J Neurosci 17:4849–4855. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-12-04849.1997

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. Behav Brain Res 256:64–71. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.07.056

Gehrke BJ, Harrod SB, Cass WA, Bardo MT (2003) The effect of neurotoxic doses of methamphetamine on methamphetamine-conditioned place preference in rats. Psychopharmacology 166:249–257. https://doi.org/10.1007/s00213-002-1318-5

Gehrke BJ, Cass WA, Bardo MT (2006) Monoamine-depleting doses of methamphetamine in enriched and isolated rats: consequences for subsequent methamphetamine-induced hyperactivity and reward. Behav Pharmacol 17:499–508. https://doi.org/10.1097/00008877-200609000-00016

Gentry W, Ghafoor A, Wessinger W et al (2004) (+)-Methamphetamine-induced spontaneous behavior in rats depends on route of (+)METH administration. Pharmacol Biochem Behav 79:751–760. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2004.10.006

German CL, Hanson GR, Fleckenstein AE (2012) Amphetamine and methamphetamine reduce striatal dopamine transporter function without concurrent dopamine transporter relocalization. J Neurochem 123:288–297. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07875.x

González-Morales E, Rodríguez-Manzo G (2020) Endocannabinoids mediate long-lasting behavioural and physiological changes in

male rats induced by the repeated activation of the mesolimbic system by copulation to satiety. Behav Brain Res 383:1–11. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112510

Grilly DM, Loveland A (2001) What is a "low dose" of d-amphetamine for inducing behavioral effects in laboratory rats? Psychopharmacology 153:155–169. https://doi.org/10.1007/s002130000580

Gu SM, Cha HJ, Seo SW et al (2019) Dopamine D1 receptor antagonist reduces stimulant-induced conditioned place preferences and dopamine receptor supersensitivity. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 393:131–138. https://doi.org/10.1007/s00210-019-01694-3

Hall DA, Stanis JJ, Marquez Avila H, Gulley JM (2008) A comparison of amphetamine- and methamphetamine-induced locomotor activity in rats: evidence for qualitative differences in behavior. Psychopharmacology 195:469–478. https://doi.org/10.1007/s00213-007-0923-8

Hiroi N, White NM (1991) The amphetamine conditioned place preference: differential involvement of dopamine receptor subtypes and two dopaminergic terminal areas. Brain Res 552:141–152. https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90672-I

Hofford RS, Darna M, Wilmouth CE et al (2014) Environmental enrichment reduces methamphetamine cue-induced reinstatement but does not alter methamphetamine reward or VMAT2 function. Behav Brain Res 270:151–158. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.05.007

Hull EM, Rodríguez-Manzo G (2017) Male sexual behavior. In: Pfaff DW, Joëls M (eds) Hormones, brain and behavior, 3rd edn. Oxford: Academic Press/Elsevier, Amsterdam, pp 1–57

Ikemoto S (2007) Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. Brain Res Rev 56:27–78. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.05.004

Ikemoto S, Panksepp J (1999) The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking. Brain Res Rev 31:6–41. https://doi.org/10.1016/S0165-0173(99)00023-5

Ito C, Onodera K, Watanabe T, Sato M (1997) Effects of histamine agents on methamphetamine-induced stereotyped behavior and behavioral sensitization in rats. Psychopharmacology 130:362–367. https://doi.org/10.1007/s002130050251

Izawa J, Yamanashi K, Asakura T et al (2006) Differential effects of methamphetamine and cocaine on behavior and extracellular levels of dopamine and 3,4-dihydroxyphenylalanine in the nucleus accumbens of conscious rats. Eur J Pharmacol 549:84–90. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.08.031

Jing L, Zhang M, Li JX et al (2014a) Comparison of single versus repeated methamphetamine injection induced behavioral sensitization in mice. Neurosci Lett 560:103–106. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.024

Jing L, Zhang Y, Li JX (2014b) Effects of the trace amine associated receptor 1 agonist RO5263397 on abuse-related behavioral indices of methamphetamine in rats. Int J Neuropsychopharmacol 18:1–7. https://doi.org/10.1093/ijnp/pyu060

Khanegheini A, Khani M, Zarrabian S et al (2021) Cannabidiol enhanced the development of sensitization to the expression of methamphetamine-induced conditioned place preference in male rats. J Psychiatr Res 137:260–265. https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2021.02.045

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC et al (2013) Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. PLoS Biol 8:1–5. https://doi.org/10.3390/ani4010035

Kuczenski R, Segal DS, Aizenstein ML (1991) Amphetamine, cocaine, and fencamfamine: Relationship between locomotor and stereotypy response profiles and caudate and accumbens dopamine dynamics. J Neurosci 11:2703–2712. https://doi.org/10.1523/jneurosci.11-09-02703.1991

Li N, Jasanoff A (2020) Local and global consequences of reward-evoked striatal dopamine release. Nature 580:239–244. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2158-3

Luis-Ravelo D, Fumagallo-Reading F, Castro-Hernandez J et al (2021) Prolonged dopamine D3 receptor stimulation promotes dopamine transporter ubiquitination and degradation through a PKC-dependent mechanism. Pharmacol Res 165:1–17. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105434

McKendrick G, Graziane NM (2020) Drug-induced conditioned place preference and its practical use in substance use disorder research. Front Behav Neurosci 14:1–15. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.582147

Morales M, Margolis EB (2017) Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. Nat Rev Neurosci 18:73–85. https://doi.org/10.1038/nrn.2016.165

Mueller D, de Wit H (2011) Conditioned place preference in rodents and humans. In: Raber J (ed) Animal models of behavioral analysis. Humana Press, New York, pp 133–152

Nall RW, Heinsbroek JA, Nentwig TB et al (2021) Circuit selectivity in drug versus natural reward seeking behaviors. J Neurochem 157:1450–1472. https://doi.org/10.1111/jnc.15297

Palmiter RD (2008) Dopamine signaling in the dorsal striatum is essential for motivated behaviors: lessons from dopamine-deficient mice. Ann N Y Acad Sci 1129:35–46. https://doi.org/10.1196/annals.1417.003

Paxinos G, Watson C (2009) The rat brain in stereotaxic coordinates, Compact 6t. Academic Press, Elsevier, UK

Pfaus JG, Damsma G, Nomikos GG et al (1990) Sexual behavior enhances central dopamine transmission in the male rat. Brain Res 530:345–348. https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91309-5

Pitchers KK, Balfour ME, Lehman MN et al (2010) Neuroplasticity in the mesolimbic system induced by natural reward and subsequent reward abstinence. Biol Psychiatry 67:872–879. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.09.036

Pritchard LM, Hensleigh E, Lynch S (2012) Altered locomotor and stereotyped responses to acute methamphetamine in adolescent, maternally separated rats. Psychopharmacology 223:27–35. https://doi.org/10.1007/s00213-012-2679-z

Reith MEA, Gnegy ME (2020) Molecular mechanisms of amphetamines. In: Nader M, Hurd Y (eds) Substance use disorders. Handbook of experimental pharmacology. Springer Nature, pp 265–297

Rodríguez-Manzo G (2015) Glutamatergic transmission is involved in the long lasting sexual inhibition of sexually exhausted male rats. Pharmacol Biochem Behav 131:64–70. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.02.002

Rodríguez-Manzo G, Fernández-Guasti A (1994) Reversal of sexual exhaustion by serotonergic and noradrenergic agents. Behav Brain Res 62:127–134. https://doi.org/10.1016/0166-4328(94)90019-1

Rodríguez-Manzo G, Guadarrama-Bazante IL, 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? Behav Brain Res 217:253–260. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.09.014

Rodríguez-Manzo G, González-Morales E, Garduño-Gutiérrez R (2021) Endocannabinoids released in the ventral tegmental area during copulation to satiety modulate changes in glutamate receptors associated with synaptic plasticity processes. Front Synaptic Neurosci 13:1–15. https://doi.org/10.3389/fnsyn.2021.701290

Salery M, Trifilieff P, Caboche J, Vanhoutte P (2020) From signaling molecules to circuits and behaviors: cell-type–specific adaptations to psychostimulant exposure in the striatum. Biol Psychiatry 87:944–953. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.11.001

Schindler CW, Bross JG, Thorndike EB (2002) Gender differences in the behavioral effects of methamphetamine. Eur J Pharmacol 442:231–235. https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)01550-9