

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

SEDE SUR

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

**Evaluación de la participación del núcleo accumbens y de
los receptores CB2 en los efectos de los endocannabinoides en
el fenómeno de saciedad sexual**

TESIS

Que presenta:

Med. Cir. Imix Lozada Méndez

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Directora de tesis:

Dra. Gabriela Rodríguez Manzo

Ciudad de México

Enero, 2024



La parte experimental de esta tesis se llevó a cabo en el laboratorio 18 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N (Sede Sur) bajo la dirección de la Dra. Gabriela Rodríguez Manzo.

Para la realización de este trabajo se contó con la beca de maestría del CONAHCYT con número de registro 802333.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Gabriela Rodríguez Manzo por haberme brindado la oportunidad de participar en su laboratorio y con su grupo de trabajo, por haberme guiado y por compartirme sus conocimientos acerca de neuromodulación de la conducta sexual de la rata macho que han sido parte durante mi formación en esta maestría. Por ser un modelo y una inspiración para ser el profesionista académico que me gustaría ser. Por su entusiasmo, entendimiento y tolerancia con sus estudiantes y finalmente por su optimismo hacia el aprendizaje y enseñanza de la ciencia, muchas gracias.

A la Dra. Silvia Lorenia Cruz Martin del Campo por sus enseñanzas durante las asignaturas que, afortunadamente, usted impartió, por sus correcciones y observaciones en cada uno de mis avances, por ser una gran profesora e investigadora

A la Dra. Ana Gisela Canseco Alba por su disposición, sus observaciones y recomendaciones en mis avances, por las sugerencias en la realización de mis experimentos y de mi escrito de tesis.

Al Dr. Emilio Galván por brindarme todo el apoyo para la realización de los distintos trámites de inscripción, obtención de beca y reinscripción a los distintos semestres.

Al Dr. René Garduño Gutiérrez por su ayuda durante mis ensayos de presentaciones, por su constante interés en los resultados de mis experimentos y por las sugerencias para poder resolver las dudas que de estos surgían.

A la técnica del laboratorio María de los Ángeles Ceja Gálvez por sus enseñanzas acerca del cuidado y manipulación de animales, de procedimientos en el laboratorio durante toda mi maestría y por su disposición para ayudarme a la realización de mis experimentos, no habría sido capaz de hacer lo que hoy en día realizo, muchas gracias.

A la Dra. Valeria Violante Soria por su disposición y calidez para resolver cualquiera que fuera mi duda, no importa si era de ámbito escolar o no, por cada una de las

correcciones y aportaciones durante mis ensayos, y que a pesar del poco tiempo que coincidimos en el laboratorio, se volvió una guía para mí.

A la Dra. Estefanía González Morales porque siempre que tenía alguna duda de mi proyecto, ya fuera experimental o teórica, siempre me ayudó a resolverla, por su valiosa enseñanza para la realización de algunos experimentos y de preparación de fármacos.

A la Dra. Damaris Albores García por su enseñanza en el manejo del software para análisis estadístico y elaboración de gráficas.

A la M. en Ciencias Mara Islas por sus consejos y por su amistad durante este periodo que coincidimos en el Cinvestav.

A mis compañeras de laboratorio, Mariana y Linda por la alegría que brindan durante las horas de actividad y por su guía en distintas técnicas moleculares.

A mis compañeros de generación, especialmente a Eva, Palmira y Pao que, a pesar de haber tenido un año de clases online, me ayudaron cuando desconocía algo y fueron un apoyo importante durante este ciclo.

A mis amigos Dani, Arthur y Cici que durante muchos años tuve la fortuna de compartir momentos inolvidables con ustedes, que, aunque tomemos caminos diferentes, siempre habrá un buen momento para poder reunirnos, muchas gracias por su amistad.

A mi terapeuta, el Dr. Colín por ayudarme a mejorar mi salud mental y poder tener seguridad en mí mismo.

A mis familiares que siempre estuvieron presentes cuando lo requería y siempre estaré agradecido por su apoyo.

A mi papá por siempre apoyarme en cada una de mis decisiones, por enseñarme su amor al fútbol y por ser mi persona favorita.

A mi mamá por su amor incondicional, por ser una mujer admirable, por su inteligencia, que, afortunadamente, creo que pude heredar.

A mi hermana por su apoyo incondicional y por ser un gran ejemplo para cualquiera que fuera su hermano menor.

A mi hermano por sus constantes pláticas y conversaciones, a pesar de que había momentos en los que quería platicar, por cada uno de los viajes para ir a disputar un partido de fútbol.

A Iago que, a pesar de no ser un humano, me ha enseñado tanto acerca de empatía, amor y lealtad.

Finalmente quisiera agradecer de manera especial a mis padres, puesto que, aunque casi no hablo o expreso mis sentimientos, saben perfectamente cuánto los amo y lo que significan para mí.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	II
LISTA DE FIGURAS	VI
ESQUEMA 1. DISEÑO EXPERIMENTAL DEL OBJETIVO 1 ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.	
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 CONDUCTA SEXUAL DE LA RATA MACHO	1
1.2 SACIEDAD SEXUAL	4
1.3 CIRCUITO MESOLÍMBICO DOPAMINÉRGICO (MSL).....	7
1.4 CIRCUITO MESOLÍMBICO Y SACIEDAD SEXUAL	10
1.5 SISTEMA ENDOCANNABINOIDE	10
1.6 SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN EL CIRCUITO MESOLÍMBICO.....	12
1.7 SISTEMA ENDOCANNABINOIDE Y SACIEDAD SEXUAL	13
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
3. HIPÓTESIS	15
4. OBJETIVOS	15
4.1 OBJETIVOS GENERALES.....	15
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS	16
5.1 ANIMALES	16
5.2 FÁRMACOS.....	16
5.3 REGISTRO DE LA CONDUCTA SEXUAL	17
5.4 PARADIGMA DE LA SACIEDAD SEXUAL.....	17
5.5 PRUEBA DE ACTIVIDAD AMBULATORIA ESPONTÁNEA	17
5.6 CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA	18
5.7 VERIFICACIÓN DEL SITIO DE IMPLANTACIÓN	18
5.8 REGISTRO DEL SIGNO DEL SÍNDROME SEROTONINÉRGICO DE POSTURA DE CUERPO APLANADO.....	19
5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	19
6. DISEÑO EXPERIMENTAL	20
6.1 OBJETIVO 1	20
6.2 OBJETIVO 2	20
6.3 OBJETIVO 3.....	21
6.4 OBJETIVO 4.....	22

7. RESULTADOS.....	23
7.1 EFECTO DEL BLOQUEO DE CB1R EN EL NACC, SOBRE LA INDUCCIÓN DE LA INHIBICIÓN SEXUAL Y DE LA HIPERSENSIBILIDAD A FÁRMACOS DE RATAS QUE COPULAN HASTA LA SACIEDAD.....	23
7.2 EFECTO DEL BLOQUEO DE CB2R SOBRE LA INDUCCIÓN DE LA INHIBICIÓN SEXUAL EN RATAS QUE COPULAN HASTA LA SACIEDAD	24
7.3 EFECTO DEL BLOQUEO DE CB2R SOBRE LA INHIBICIÓN SEXUAL DE RATAS SEXUALMENTE SACIADAS.....	25
7.4 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRA-NACC DE AEA SOBRE LA CONDUCTA SEXUAL DE RATAS MACHO SEXUALMENTE SACIADAS.....	26
8. DISCUSIÓN	27
8.1 PARTICIPACIÓN DE LOS CB1R DEL NACC EN LAS ACCIONES DE LOS ECBS PARA LA INDUCCIÓN DE LOS FENÓMENOS DE INHIBICIÓN SEXUAL E HIPERSENSIBILIDAD A FÁRMACOS DE RATAS SEXUALMENTE SACIADAS	27
8.2 PAPEL DE LOS CB2R EN LA INDUCCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA INHIBICIÓN SEXUAL DE RATAS QUE COPULAN HASTA LA SACIEDAD.....	31
8.3 LA ACTIVACIÓN DE CB1R EN EL NACC REVIERTE LA INHIBICIÓN SEXUAL DE RATAS SEXUALMENTE SACIADAS.....	32
9. CONCLUSIONES.....	36
10. PERSPECTIVAS.....	37
11. REFERENCIAS.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del patrón copulatorio típico de una rata macho sexualmente experta

Figura 2. Saciedad sexual. Porcentaje de ratas macho que presenta las diferentes conductas sexuales, a las 24 horas post-saciedad en comparación con ratas sexualmente expertas

Figura 3. Distribución de los receptores a cannabinoides CB1R y CB2R en el circuito mesolímbico

Figura 4. Porcentaje de ratas macho sexualmente saciadas, pretratadas con distintas concentraciones de AM251, que presenta las distintas respuestas de conducta sexual y el signo de postura de cuerpo aplanado en respuesta al 8-OH-DPAT

Figura 5. Porcentajes de ratas sexualmente saciadas, pretratadas con AM630 que presentan las respuestas de conducta sexual

Figura 6. Porcentaje de ratas sexualmente saciadas que presenta las respuestas de conducta sexual en respuesta al AM630

Figura 7. Porcentaje de animales sexualmente saciados que presenta respuestas de conducta sexual tratadas con AEA intra-NAcc

Figura 8. Expresión de receptores CB1, CB2, D1 y D2 en neuronas del NAcc.

Figura 9. Mecanismo propuesto por el cual el bloqueo de los CB2R facilitaría la reversión de la inhibición sexual, a través de evitar la inhibición de la liberación de DA.

Figura 10. Mecanismo propuesto por el cual los eCBs participarían en el mantenimiento de la inhibición sexual a través de inhibir la liberación de glutamato en las terminales glutamatérgicas y a través de inhibir la actividad de las FSI

Esquema 1. Diseño experimental del objetivo 1

Esquema 2. Diseño experimental del objetivo 2

Esquema 3. Diseño experimental del objetivo 3

Esquema 4. Diseño experimental del objetivo 4

Tabla 1. Actividad locomotora espontánea de animales sexualmente saciados tratados por vía i.p. con distintas dosis de AM630 o su vehículo

Tabla 2. Actividad locomotora espontánea de animales sexualmente saciados tratados por vía intra-NAcc con distintas concentraciones de AEA o su vehículo

RESUMEN

Las conductas recompensantes naturales, como la conducta sexual, activan al circuito mesolímbico (MSL) dopaminérgico. La cópula repetida hasta la saciedad da por resultado la aparición de un período de inhibición sexual de larga duración acompañado de una hipersensibilidad generalizada a fármacos. Por otro lado, el MSL modula la expresión de la conducta sexual masculina y es, a su vez, regulado por el sistema endocannabinoide (eCB). En este trabajo se exploró la participación del sistema eCB en el núcleo accumbens (NAcc) en la inducción de los fenómenos de inhibición sexual y de hipersensibilidad al 8-OH-DPAT de ratas macho en el modelo de saciedad sexual, y se analizó la participación de los receptores a cannabinoides tipo 2 (CB2R) en las acciones de los eCBs sobre la saciedad sexual. También se evaluó el efecto de la administración intra-NAcc de anandamida exógena sobre la conducta sexual de ratas sexualmente saciadas. Los resultados mostraron que hay liberación de eCBs en el núcleo accumbens durante la cópula hasta la saciedad, que contribuyen a la inducción de la hipersensibilidad a fármacos mas no a la de la inhibición sexual de larga duración, a través de activar receptores a cannabinoides tipo 1 (CB1R). Los CB2R participan en el mantenimiento de la inhibición sexual de las ratas sexualmente saciadas, pero no en su inducción. La administración exógena de AEA en el NAcc revierte la inhibición sexual de los machos sexualmente saciados. En este efecto la AEA mostró un perfil bifásico. Se concluye que las acciones de los eCBs relacionadas con el fenómeno de saciedad sexual que tienen lugar en el MSL involucran al NAcc y que en ellas participan tanto los CB1R como los CB2R.

ABSTRACT

Natural rewarding behaviors, like sexual behavior, activate the mesolimbic dopaminergic system (MSL). Repeated copulation until sexual satiety results in the emergence of a long-lasting sexual behavior inhibition that is accompanied by a generalized drug hypersensitivity. The MSL modulates male sexual behavior expression, while being modulated by the endocannabinoid (eCB) system. This study explored the participation of the eCB system at the nucleus accumbens (NAcc) in the induction of the sexual inhibition and the hypersensitivity to 8-OH-DPAT in male rats using the sexual satiety model and analyzed the participation of type 2 cannabinoid receptors (CB2R) in eCB actions on sexual satiety. It also tested the effect of the intra-NAcc administration of exogenous anandamide in the sexual behavior of sexually satiated rats. Results showed that eCBs are released in the NAcc during copulation to satiety, which contribute to the induction of drug hypersensitivity but not to that of the long-lasting sexual inhibition, through the activation of type 1 cannabinoid receptors (CB1R). CB2Rs play a role in the maintenance of the sexual inhibitory state of sexually satiated rats but not in its induction. The exogenous administration of AEA directly into the NAcc reverses sexual satiety, showing a biphasic profile in this effect. It is concluded that eCB actions related to the sexual satiety phenomenon that take place at the MSL, involve the NAcc and that both CB1R and CB2R participate in these effects.

1. INTRODUCCIÓN

Las conductas recompensantes naturales están relacionadas con la supervivencia de los individuos y/o de las especies. Estas conductas reciben el nombre de conductas motivadas y se modulan en el circuito mesolímbico (MSL) dopaminérgico, también conocido como el circuito de la recompensa (Kelley & Berridge, 2002). La conducta sexual es una conducta motivada, por lo que a través del análisis de su expresión podemos estudiar los mecanismos por medio de los cuales el circuito MSL regula su expresión.

El sistema endocannabinoide es un sistema de neurotransmisión que modula la actividad neuronal. Este sistema está compuesto de los endocannabinoides (eCBs), los receptores a cannabinoides (CB1 y CB2) y las enzimas que participan en su síntesis y degradación. Las neuronas producen eCBs en respuesta a su actividad neuronal intensa (Freund et al., 2003) y el principal efecto de esos eCB es disminuir la liberación de los neurotransmisores responsables del aumento en la actividad neuronal, a través de una señalización retrógrada (activación de receptores CB1 localizados en las terminales presinápticas (Alger, 2002).

En este trabajo se analiza la participación del sistema endocannabinoide, a través de los receptores a eCBs tanto tipo CB1 como CB2, en la modulación de la expresión de la conducta sexual masculina en el modelo de saciedad sexual. Así mismo, se examina la participación del circuito MSL, específicamente del núcleo accumbens, en las acciones de los eCBs sobre la conducta sexual masculina.

1.1 Conducta sexual de la rata macho

La conducta sexual de la rata macho se divide en dos fases: la conducta pre-copulatoria y la conducta copulatoria. Durante la conducta pre-copulatoria, la rata macho atrae a la hembra receptiva mediante la orina, cuyo olor tiene gran valor incentivo, y mediante el olfateo anogenital. La fase copulatoria está constituida por un patrón motor estereotipado, formado por tres conductas motoras distintas: la conducta de monta (M), la conducta de intromisión (I) y la conducta de eyaculación (E) (Figura 1), que se describen a continuación.

Conducta de monta

La rata macho monta a la hembra por el dorso, palpando sus flancos traseros mientras mantiene las patas traseras en el suelo. Posteriormente realiza movimientos pélvicos intentando localizar la entrada a la vagina de la hembra. Al no lograr la inserción del pene dentro de la vagina, el macho desmonta a la hembra lentamente.

Conducta de intromisión

La intromisión es la conducta definitoria de la cópula; la rata macho monta a la hembra, realiza movimientos pélvicos y logra la inserción del pene en la vagina. La hembra debe presentar la respuesta de lordosis, una respuesta refleja que consiste en el arqueamiento de la columna vertebral, para permitir la inserción peneana y que el macho logre la intromisión. La rata macho continúa con un embite más profundo, con una duración promedio de 200 a 300 ms (Beyer et al., 1981) y finalmente, desmonta a la hembra con un salto hacia atrás, de forma brusca, seguido del acicalamiento de sus genitales (Bitran & Hull, 1987).

Conducta de eyaculación

Esta conducta consiste en una intromisión con una duración mayor (750 a 2000 ms), en la que el macho realiza movimientos pélvicos y que culmina con la emisión del líquido seminal. Después de ello, el macho levanta las patas delanteras y desmonta lentamente a la hembra, cayendo en ocasiones de lado y finaliza con el acicalamiento de sus genitales.

Después de la eyaculación, se presenta un periodo de inactividad sexual conocido como intervalo post-eyaculatorio (IPE). Este intervalo se define como el tiempo que transcurre desde la eyaculación hasta el reinicio de la actividad sexual por parte del macho, que es determinado por la presentación de una nueva intromisión. Este periodo refractario tiene una duración de 5 a 8 minutos después de la primera eyaculación, y su duración se prolonga con cada eyaculación sucesiva. El 75% de la duración inicial del IPE se denomina periodo refractario absoluto; durante éste las ratas macho emiten vocalizaciones ultrasónicas de 22 KHz y no se puede inducir la presentación de conducta sexual. En el 25% final de la duración del

IPE, las ratas macho ya no emiten vocalizaciones y pueden responder con actividad sexual ante estímulos eléctricos o ante una hembra receptiva diferente; a este periodo se le llama periodo refractario relativo (Hull & Rodríguez-Manzo, 2017). Las conductas previamente descritas pueden ser reconocidas y registradas durante la observación de la interacción sexual.

Cuando la rata macho alcanza la pubertad muestra actividad sexual de forma espontánea pues se trata de una conducta instintiva, sin embargo, el patrón copulatorio se estabiliza mediante la experiencia, lo que lo hace muy regular. Una rata macho que es expuesta por primera vez a una hembra sexualmente receptiva pasará mucho tiempo mostrando conductas pre-copulatorias antes de iniciar con las conductas de monta e intromisión. Asimismo, presenta un número elevado de montas y de intromisiones previas a la eyaculación. Mediante la experiencia sexual las ratas macho hacen más eficaz su conducta sexual, de tal manera que disminuyen los tiempos de presentación de las respuestas de intromisión y de eyaculación y reducen el número de montas e intromisiones necesario para alcanzar la eyaculación. Con la experiencia sexual el patrón copulatorio de la rata macho se vuelve estable y muy similar entre individuos, lo que ha permitido el establecimiento de parámetros temporales y numéricos para evaluar la conducta sexual masculina. Estos parámetros son:

- Latencia de monta (LM): tiempo transcurrido desde que la hembra y el macho entran en contacto hasta la aparición de la primera monta o intromisión.
- Latencia de intromisión (LI): tiempo transcurrido desde que la hembra y el macho entran en contacto hasta que se presenta la primera intromisión.
- Latencia de eyaculación (LE): tiempo transcurrido desde la primera intromisión hasta la eyaculación, que marca el fin de una serie eyaculatoria.
- Intervalo post-eyaculatorio (IPE): tiempo transcurrido entre la eyaculación y la primera intromisión de una nueva serie copulatoria.
- Montas (M): número de montas que se presentan antes de la eyaculación.
- Intromisiones (I): número de intromisiones que se presentan antes de la eyaculación.

- Eyaculaciones (E): número de eyaculaciones que se presentan en un periodo de observación determinado.

Además, se pueden calcular los siguientes parámetros:

- Índice de éxito (hit rate): el número de intromisiones dividido entre la suma del número de montas e intromisiones.
- Intervalo inter-intromisiones: la latencia de eyaculación dividida entre el número de intromisiones.
- Índice copulatorio: la suma del número de montas e intromisiones dividida entre el tiempo transcurrido desde la primera conducta (monta o intromisión) hasta la eyaculación (Heijkoop et al., 2017).

A la serie de conductas presentadas desde la primera intromisión hasta la eyaculación se le denomina serie eyaculatoria, y cuando se incluye al intervalo post-eyaculatorio se le denomina serie copulatoria.

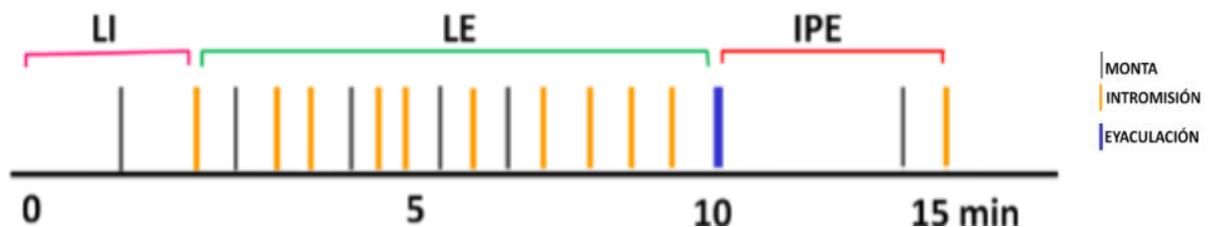


Figura 1. Representación esquemática del patrón copulatorio típico de una rata macho sexualmente experta. Se ilustran las montas (líneas grises) intercaladas con las intromisiones (líneas amarillas) que preceden a la eyaculación (línea azul). También se esquematizan los parámetros temporales que son la latencia de intromisión (LI), latencia de eyaculación (LE) y el intervalo post-eyaculatorio (IPE). Modificado de Rodríguez-Manzo y Fernández-Guasti (1994).

1.2 Saciedad sexual

Cuando se permite a ratas macho sexualmente expertas copular sin restricción con una misma hembra receptiva, éstas presentarán eyaculaciones sucesivas (5 a 12, 7 en promedio) antes de dejar de copular. Cuando lo hacen, se considera que están

sexualmente saciadas. La saciedad sexual es un estado de inhibición de la conducta sexual de larga duración que se establece por la cópula repetida y se mantiene hasta 72 horas, a partir de las cuales la rata macho se recupera gradualmente. No obstante, se necesitan hasta 15 días de inactividad sexual para que los animales sexualmente saciados recuperen su capacidad eyaculatoria inicial (Rodríguez-Manzo et al., 2011). A las 24 horas después de alcanzar la saciedad sexual, las ratas macho pueden manifestar la inhibición sexual de dos formas distintas en presencia de una hembra sexualmente receptiva (Figura 2):

- dos tercios de la población no presenta conducta sexual, y
- el tercio restante realiza una serie eyaculatoria, después de la cual no reinicia la actividad sexual

El criterio utilizado para considerar que una rata macho ha llegado a la saciedad sexual es que, después de permitirle copular *ad libitum*, transcurra un período de 90 minutos desde la última eyaculación sin que vuelva a eyacular. Se ha observado que este criterio se cumple en un periodo de aproximadamente 4 horas, sin importar la capacidad eyaculatoria individual de los machos (Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1994).

La inhibición sexual que se presenta durante la saciedad sexual es regulada por distintos neurotransmisores. Esto se ha demostrado a través de manipulaciones farmacológicas a las 24 horas post-saciedad, cuando la inhibición sexual está bien establecida, que dan por resultado la reversión de la saciedad sexual. Es decir, que los tratamientos son capaces de aumentar significativamente el porcentaje de animales sexualmente saciados que eyacula y reinicia la cópula después de la eyaculación a las 24 horas post-saciedad. Entre los neurotransmisores que se ha identificado que participan en el mantenimiento de esta inhibición sexual de larga duración están: la norepinefrina (NE), la serotonina (5-HT) (Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti 1994), los opioides endógenos (Garduño-Gutiérrez et al., 2013b), los endocannabinoides (eCBs) (Canseco-Alba & Rodríguez-Manzo, 2014; Canseco-Alba & Rodríguez-Manzo, 2019), el glutamato (Rodríguez-Manzo, 2015), el GABA

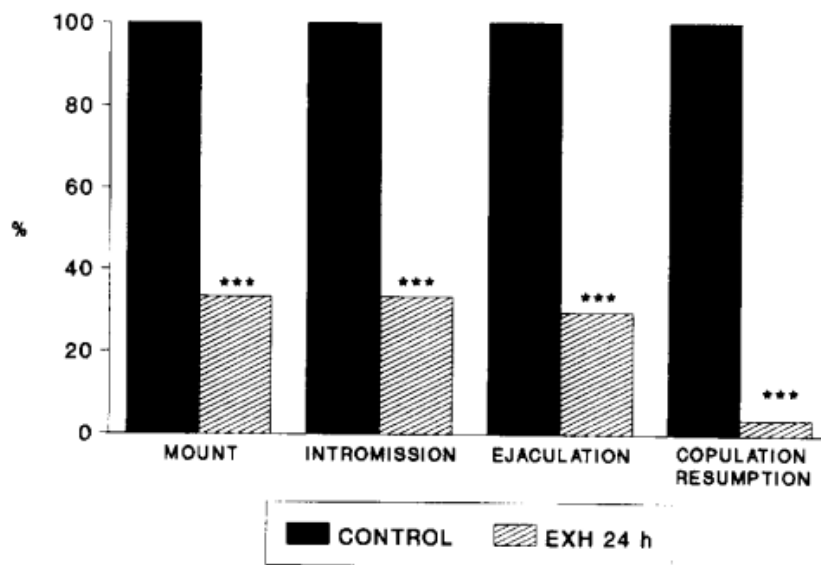


Figura 2. Saciad sexual. Porcentaje de ratas macho que presenta las diferentes conductas sexuales, a las 24 horas post-saciad (barras asuradas) en comparaci3n con ratas sexualmente expertas (barras negras). Figura tomada de Rodr3guez-Manzo & Fern3ndez-Guasti, 1994.

(Rodr3guez-Manzo & Canseco-Alba, 2017) y la dopamina (DA) (Rodr3guez-Manzo, 1999; Guadarrama-Bazante et al., 2014).

Por otro lado, se ha demostrado que durante la c3pula hasta alcanzar la saciad sexual hay liberaci3n de opioides end3genos (Gardu3o-Guti3rrez et al., 2013a) y de eCBs (Canseco-Alba & Rodr3guez-Manzo, 2014; Gonz3lez-Morales & Rodr3guez-Manzo, 2020) que contribuyen al establecimiento de la inhibici3n sexual.

Las ratas macho sexualmente saciadas muestran otras alteraciones adem3s de la inhibici3n de la conducta sexual, entre las que destaca una hipersensibilidad de larga duraci3n generalizada a f3rmacos. Se ha documentado este efecto entre otros f3rmacos para la yohimbina (antagonista de adrenoceptores α_2), la 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina (8-OH-DPAT, agonista de receptores 5-HT_{1A}), la naloxona y la naltrexona (antagonistas de receptores opioides μ y δ) y la

desipramina (inhibidor de la recaptura de noradrenalina) (Martínez-Mota et al., 2005; Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1994; 1995).

Así, la saciedad sexual es un fenómeno complejo que consiste en una inhibición de la conducta sexual, que se acompaña de otros cambios fisiológicos de larga duración.

1.3 Circuito mesolímbico dopaminérgico (MSL)

El circuito MSL está conformado por neuronas dopaminérgicas (DAérgicas) localizadas en el área tegmental ventral (ATV) del cerebro medio y cuyas proyecciones alcanzan el núcleo accumbens (NAcc), la amígdala, el hipocampo y la corteza prefrontal (Ikemoto 2010). El MSL modula las conductas recompensantes naturales, entre ellas, la conducta sexual. Este circuito se activa durante la cópula. Así, se ha reportado el incremento de la actividad de las neuronas dopaminérgicas (evaluado por la expresión de la proteína Fos) en el ATV como resultado de la actividad sexual (Balfour et al., 2004) y se ha demostrado que durante la cópula hay un aumento en la liberación de DA en el núcleo accumbens (NAcc) (Pfaus et al, 1990).

La actividad de las neuronas DAérgicas del MSL está regulada en el ATV por interneuronas GABAérgicas y neuronas GABAérgicas extrínsecas que ejercen una inhibición tónica, lo que determina su actividad basal tipo marcapaso, y por neuronas glutamatérgicas extrínsecas, que las estimulan en respuesta a estímulos recompensantes (Grace et al., 2007). La liberación de DA de las terminales en el NAcc es modulada a nivel local por distintos neurotransmisores (Covey & Yocky, 2021). Las terminales DAérgicas en el NAcc hacen sinapsis principalmente con las neuronas espinosas medias (MSN, por sus siglas en inglés) (Ikemoto, 2010).

Núcleo accumbens (NAcc)

El NAcc está conformado en un 95% por las MSN y el 5% restante por interneuronas GABAérgicas y colinérgicas. Las MSN son las neuronas GABAérgicas de proyección del NAcc, mientras que las interneuronas mantienen exclusivamente comunicación local (Girault, 2012).

Neuronas espinosas medias (MSN)

Las MSN reciben ese nombre por su tamaño (15 μm de diámetro en promedio) y por sus dendritas que están cubiertas por pequeñas protrusiones de membrana en forma de espinas. Las MSN muestran una tasa de disparo basal baja (1Hz) in vivo (Meredith, 1999). Las MSN están organizadas en dos poblaciones, por un lado, están las que expresan receptores DAérgicos de la familia tipo D1 (receptores D1 y D5) excitatorios, acoplados a $G_{\alpha s}$ que estimulan a la adenilato ciclasa aumentando la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPc), mientras que por otro lado están las MSN que expresan receptores DAérgicos de la familia tipo D2 (receptores D2, D3 y D4) inhibitorios acoplados a $G_{\alpha i/o}$ que inhiben la producción de AMPc. Las MSN-D1 proyectan directamente al área tegmental ventral (ATV) del mesencéfalo y forman la denominada vía directa, a diferencia de las MSN-D2 que proyectan primero al pálido ventral (PV) y de ahí hacen relevo al ATV, formando la vía indirecta (Allichon et al., 2021).

Interneuronas

Existen tres tipos de interneuronas en el NAcc: dos subtipos de interneuronas GABAérgicas, de naturaleza inhibitoria, que se diferencian por la expresión de proteínas específicas: las interneuronas de disparo rápido (*fast spiking interneurons*, FSI) que expresan parvalbúmina (PaVa) y las interneuronas de disparo de bajo umbral (*low threshold spiking interneurons*, LTSI) que expresan somatostatina (SOM), neuropéptido Y (NPY) y sintasa de óxido nítrico (NOS). Finalmente están las interneuronas colinérgicas (CIN) tónicamente activas, de naturaleza excitatoria (Tepper et al., 2018).

Interneuronas de disparo rápido (FSI)

Las FSI poseen dendritas compactas, pero altamente ramificadas que pueden inervar a una gran cantidad de MSN (tanto MSN-D1 como MSN-D2) e inhibirlas. Se ha documentado que tan solo una FSI es capaz de inervar hasta 15,000 MSN en su proximidad, por lo tanto, se considera que las FSI son la principal fuente de inhibición de las MSN en el NAcc (Wright et al., 2017). Las FSI no hacen sinapsis

con las LTSI o con las CIN (Winters et al. 2012). La activación de las FSI es mediada por estímulos excitatorios provenientes de distintas regiones cerebrales como la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala basolateral. Las FSI tienen una función de tipo compuerta “*gatekeeper*”: al activarse inhiben la actividad de las MSN. Esta señalización a gran escala resulta en la modificación de distintas conductas motivadas (Schall et al., 2021).

Interneuronas de disparo de bajo umbral (LTSI)

Las LTSIs tienen un tamaño aproximado 9-24 μm y se caracterizan por mostrar un patrón de disparo autónomo. Esta autonomía se explica porque existe una corriente persistente de sodio que garantiza la activación y el disparo continuo de estas interneuronas (Beatty et al. 2012). Su efecto inhibitorio es débil en comparación con las FSI, sin embargo, debido a que expresan NOS, SOM y NPY son un modulador importante de la excitabilidad y la plasticidad sináptica, así como de las conductas motivadas. Sus proyecciones hacen sinapsis con las MSN-D1 y MSN-D2 y con las CIN (Holly et al., 2021)

Interneuronas colinérgicas (CINs)

Las CIN se distinguen fácilmente porque son más grandes que otras neuronas (20-50 μm) y poseen abundantes arborizaciones axonales y dendríticas (Contant et al., 1996). Las CIN están tónicamente activas y disparan a una frecuencia de 2 a 12 Hz. Esta actividad es autónoma debido principalmente a la corriente de sodio persistente a través de los canales NaV1.6. (Wilson, 2005). Las CINs expresan receptores a DA, principalmente de tipo D2, por lo que la DA tiene una influencia inhibitoria sobre su actividad. El GABA proveniente de las interneuronas GABAérgicas puede inhibir la actividad de las CIN a través de receptores GABA_A (Sato et al. 2014) y las CIN también pueden autoinhibirse, a través de los receptores muscarínicos M2 y M4 que expresan (Smiley et al. 1999). La acetilcolina (ACh) proveniente de las CIN modula la actividad de las MSN a través de receptores muscarínicos tipo M1 y M4 (Yan et al., 2001). También modula la liberación de DA en el NAcc, a través de receptores nicotínicos (nAChR) que se expresan en las

terminales DAérgicas (Cachope, 2014). Las CIN son moduladores clave de las conductas recompensantes (Sakae et al., 2015).

1.4 Circuito mesolímbico y saciedad sexual

Se ha demostrado que el aumento en los niveles de DA en el NAcc producido por la actividad sexual se mantiene durante todo el proceso de cópula hasta la saciedad (Canseco-Alba et al., 2022; Fiorino et al., 1997), lo que indica que el circuito MSL es activado constantemente durante el desarrollo de la saciedad sexual. Por otro lado, también se ha demostrado que durante la cópula hasta la saciedad hay liberación de opioides endógenos que contribuyen al establecimiento de la inhibición sexual de las ratas sexualmente saciadas (Garduño-Gutiérrez et al., 2013a), a través de activar receptores opioides tipo mu (MOR) en el ATV (Garduño-Gutiérrez et al., 2013b, c). Así mismo, se ha establecido que en el ATV hay liberación de endocannabinoides durante la cópula hasta la saciedad (González-Morales & Rodríguez-Manzo, 2020), que también participan en el establecimiento de la inhibición sexual de ratas saciadas a través de activar receptores a cannabinoides tipo 1 (Canseco-Alba & Rodríguez-Manzo, 2014).

1.5 Sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide (eCB) está constituido por los eCBs, los receptores a cannabinoides tipo 1 (CB1R) y tipo 2 (CB2R), así como por las enzimas que participan en la síntesis y degradación de los eCBs. Los eCB son mensajeros químicos de naturaleza lipídica que se producen “a demanda”, en respuesta a la estimulación neuronal (Alger & Kim, 2011). Estos mensajeros se sintetizan a partir de los fosfolípidos de la membrana de las neuronas y su señalización es de forma retrógrada, es decir, se liberan del soma de las neuronas postsinápticas y se unen principalmente a los CB1R, localizados en las terminales de las neuronas presinápticas (Zhou & Kumar, 2018).

Entre los eCBs mejor caracterizados se encuentran la anandamida (N-araquidonoiletanolamida, AEA) y el 2-araquidonoilglicerol (2-AG). Las enzimas hidrolasa N-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipasa D (NAPE-PLD) y la hidrolasa amida de ácidos grasos (FAAH) son las responsables de la síntesis y degradación de la AEA, respectivamente, mientras que las enzimas diacilglicerol lipasa (DAGL)

y monoacilglicerol lipasa (MAGL) son las responsables de la síntesis y degradación del 2-AG, respectivamente (Fakhoury, 2016). La AEA tiene una alta afinidad por el CB1R, pero una eficacia de alrededor del 60%, por lo que es considerada un agonista parcial, y tiene baja afinidad por el CB2R (Pertwee, 2015). Por otro lado, el 2-AG tiene una afinidad moderada tanto por el CB1R como por el CB2R, sin embargo, tiene una mayor eficacia y se comporta como agonista completo únicamente en el CB1R (Hillard, 2000).

Los CB1R y CB2R son receptores acoplados a proteínas G (Gi/o), sensibles a la toxina pertussis (Pertwee et al., 2010). Su activación inhibe a la adenilato ciclasa (AC) y, por lo tanto, la formación de AMPc, disminuye la entrada de Ca^{2+} al inhibir a los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo N, tipo P/Q y tipo R y aumenta la conductancia al K^{+} a través de los canales rectificadores de este ion (GIRK). La estimulación de los CBR también activa la señalización de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Los CB1R también son capaces de activar a la proteína G a través de la asociación con la β -arrestina y la activación de la ruta PI3K/Akt (De Laurentiis, et al., 2002).

Los CB1R se expresan principalmente en el cerebro, mientras que los CB2R se expresan mayormente en la periferia, en células del sistema inmune. Estos últimos fueron descubiertos en el bazo y se expresan en distintos sitios como los nódulos linfáticos, plaquetas de Peyer del intestino delgado, en células sanguíneas como linfocitos, neutrófilos polimorfonucleares y monocitos (Cabral et al., 2008); finalmente también se expresan en la microglía, aumentando su expresión durante procesos neuroinflamatorios (Pietr et al., 2009). Sin embargo, recientemente se ha documentado la expresión de CB2R en neuronas de varias regiones del cerebro como la corteza prefrontal, el hipocampo y también en el circuito MSL (Zhang et al., 2015).

1.6 Sistema endocannabinoide en el circuito mesolímbico

En el ATV, los CB1R se expresan en las terminales de las neuronas GABAérgicas (Szabo et al., 2002) y glutamatérgicas (Melis, 2004), mientras que en el NAcc los CB1R se encuentran en las terminales glutamatérgicas (Robbe et al., 2001) y en las FSI (Winters et al., 2012). La activación de estos CB1R disminuye la liberación del neurotransmisor (Wilson & Nicoll, 2002). Los CB2R se han localizado en los somas de las neuronas DAérgicas en el ATV y su activación inhibe el disparo neuronal (Zhang et al., 2014; 2017). En el NAcc, los CB2R se han detectado en las MSN-D1 y en las MSN-D2 (Ferranti & Foster, 2022; Zhang et al., 2021) y su estimulación inhibe la actividad de las MSN. También hay expresión de CB2R en las terminales de las neuronas DAérgicas cuya activación inhibe la liberación de DA (Foster et al., 2016). Dentro del circuito MSL, los eCB se producen en los somas de las neuronas DAérgicas del ATV y en los somas de las MSN del NAcc (Gardner, 2005).

El sistema eCB es un modulador de la actividad del circuito MSL (Ameri, 1999; van der Stelt & Di Marzo, 2003) y participa en la modulación de procesos fisiológicos como el aprendizaje y la memoria, el dolor, el estrés y las conductas recompensantes (Kaczocha & Haj-Dahmane, 2022).

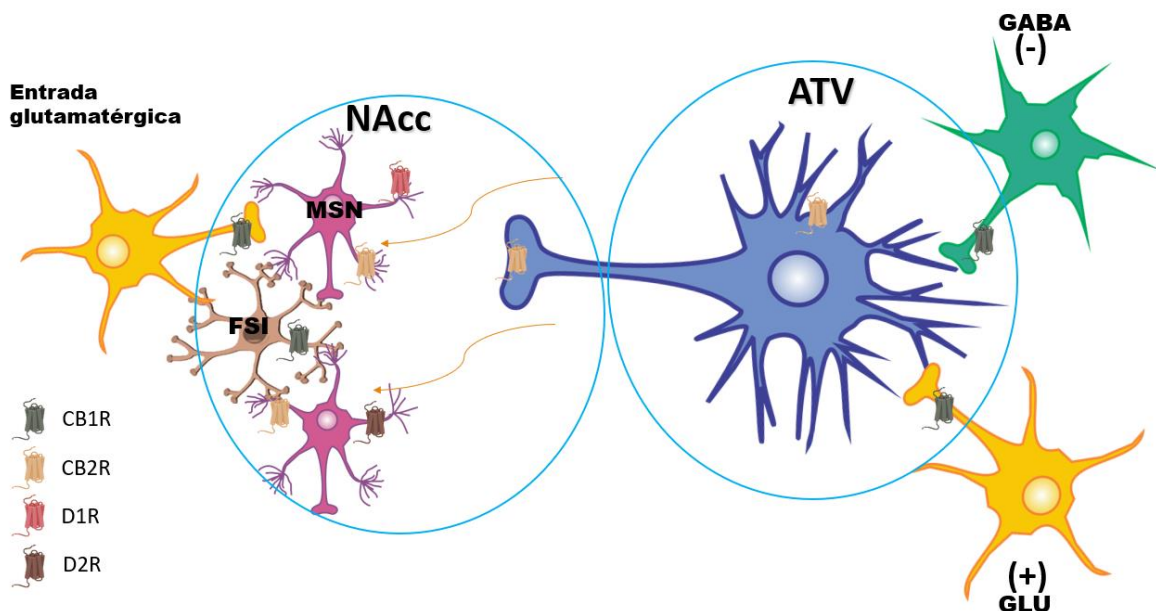


Figura 3. Distribución de los receptores a cannabinoides CB1R y CB2R en el circuito mesolímbico. Las neuronas azules representan a las dopaminérgicas, las rosas a las neuronas espinosas medias GABAérgicas (MSN) y la café, a las interneuronas GABAérgicas de disparo rápido (FSI).

1.7 Sistema endocannabinoide y saciedad sexual

En estudios de nuestro laboratorio se demostró que la AEA y el 2-AG revierten la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas. La AEA tiene un efecto bifásico, dependiente de la dosis, sobre la conducta sexual de la rata macho. A dosis bajas la facilita y a dosis altas la inhibe (Rodríguez-Manzo & Canseco-Alba, 2015). Este perfil bifásico se mantiene en los animales sexualmente saciados, ya que dosis bajas de AEA, administradas por vía sistémica (Canseco-Alba & Rodríguez-Manzo, 2014) o intra-ATV (Canseco-Alba & Rodríguez-Manzo, 2016), revierten la saciedad sexual, pero el efecto se pierde a dosis altas. El 2-AG, en cambio, revierte la saciedad sexual en un rango de dosis más amplio y no presenta un perfil bifásico. Esta reversión se debe a la interacción de estos eCBs con el sistema dopaminérgico, puesto que el 2-AG sinergiza con un agonista de los receptores dopaminérgicos del tipo D2 (quinpirola) para revertir la saciedad sexual y un antagonista D2 (racloprida) cancela la reversión producida por 2-AG. La AEA en cambio, sinergiza con agonistas de ambos tipos de receptores dopaminérgicos para revertir la saciedad sexual, pero sólo un antagonista D1 bloquea la reversión de la saciedad sexual producida por AEA (Canseco-Alba & Rodríguez-Manzo, 2019).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

- La cópula hasta la saciedad involucra la activación continua del MSL y se ha demostrado que ésta induce la liberación de eCB.
- Las ratas sexualmente saciadas presentan cambios conductuales y fisiológicos de larga duración que sugieren plasticidad cerebral, entre los que destacan un periodo de inhibición sexual de larga duración y una hipersensibilidad generalizada a fármacos, que se detectan a las 24 h post-saciedad, permanecen hasta las 72 h y desaparecen a las 96 h post-saciedad.
- Datos de nuestro laboratorio muestran que los eCBs liberados durante el proceso de cópula hasta la saciedad participan en la inducción de estos cambios plásticos, a través de activar receptores CB1 del ATV.
- También se ha demostrado que la administración exógena de eCBs, por vía sistémica, revierte la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas y que este efecto se replica cuando el eCB AEA se administra directamente en el ATV.
- Sin embargo, no se sabe si hay liberación de eCBs en el NAcc durante la cópula hasta la saciedad, ni si éstos juegan un papel en la inducción de los cambios de larga duración de las ratas sexualmente saciadas a través de activar receptores CB1 (CB1R). Tampoco se sabe si los receptores CB2 (CB2R) participan en las acciones de los eCBs sobre la saciedad sexual, ni si la administración exógena de eCBs en el NAcc revierte la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas.

Por lo tanto, sería importante evaluar el papel de los eCB del NAcc en la modulación en la conducta sexual de ratas macho que copulan hasta la saciedad.

3. HIPÓTESIS

- 1) Durante la cópula hasta la saciedad hay síntesis y liberación de eCBs de las MSN del NAcc que contribuyen a la inducción de los cambios plásticos que caracterizan a las ratas sexualmente saciadas.
- 2) Los CB2R participan en la inducción y mantenimiento de la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas mediadas por los eCBs.
- 3) Los eCBs administrados directamente en el NAcc no revertirán la saciedad sexual.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos generales

1. Establecer la posible participación de eCBs, producidos en el NAcc durante la cópula hasta la saciedad, en la inducción de la inhibición sexual y de la hipersensibilidad a fármacos, a través de la activación de CB1R.
2. Evaluar la participación de CB2R en los efectos de los eCBs para el establecimiento y mantenimiento de la saciedad sexual.
3. Determinar si la administración exógena de eCBs en el NAcc es capaz de revertir la saciedad sexual.

4.2 Objetivos particulares

1. Establecer el efecto de la administración intra-NAcc del antagonista de CB1R, AM251, sobre el establecimiento de la inhibición sexual y la inducción de la hipersensibilidad a 8-OH-DPAT en ratas macho que copulan hasta la saciedad.
2. Determinar el efecto del bloqueo de CB2R durante la cópula hasta la saciedad sobre la inducción de la inhibición sexual de ratas que copulan hasta la saciedad.
3. Evaluar el efecto de la administración i.p. del antagonista CB2R, AM630, sobre la conducta sexual de ratas sexualmente saciadas.
4. Establecer el efecto de la administración intra-NAcc del eCB AEA sobre la conducta sexual de ratas macho sexualmente saciadas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Animales

Se utilizaron ratas macho sexualmente expertas de la cepa Wistar (250 g-300 g de peso). Las ratas macho que mostraron latencias de eyaculación menores a 15 min, en al menos 3 sesiones de cópula independientes, se consideraron sexualmente expertas y se seleccionaron para los experimentos. Se usaron ratas hembra intactas, sexualmente receptivas, como estímulo sexual. La receptividad se indujo por medio de la administración secuencial de benzoato de estradiol (12 µg/sujeto vía s.c.) seguida, 24 h después, de progesterona (6 mg/sujeto vía s.c.). La receptividad se presentó 4 h después de la administración de progesterona a las hembras. Los animales se mantuvieron alojados en cajas de acrílico (8 animales por caja), bajo un ciclo invertido de luz/obscuridad (12h:12h, la luz se encendió a las 10:00 AM), temperatura y humedad controladas y con comida y agua *ad libitum*.

5.2 Fármacos

Fármaco	Mecanismo de acción	Preparación	Vía de administración
Anandamida disuelta en Trocrisolve (AEA)	Agonista CB1R y CB2R	Solución de aceite de soya (25%) y agua (75%)	Intra-NAcc
AM251	Antagonista CB1R	Solución de agua salina, DMSO (1 gota) y TWEEN 80 (2 gotas)	Intra-NAcc
AM630	Antagonista CB2R	Solución de agua salina, DMSO (2 gotas) y TWEEN 80 (4 gotas)	Intraperitoneal
Tocrisolve	Vehículo	Solución de aceite de soya (25%) y agua (75%)	Intra-NAcc

5.3 Registro de la conducta sexual

El registro de la conducta sexual masculina se realizó en cilindros de acrílico con una cama de aserrín, durante la fase oscura del ciclo, en un cuarto iluminado con luz roja. Se introdujo al macho al cilindro y se le permitieron 5 min para que explorara el ambiente antes de introducir a una hembra sexualmente receptiva. Se registró su actividad sexual determinando los siguientes parámetros de la cópula: latencia de intromisión (LI), latencia de eyaculación (LE), número de montas (M), número de intromisiones (I), intervalo post eyaculatorio (IPE) y número de eyaculaciones (E). También se estableció la proporción de ratas macho que mostró las distintas respuestas de la cópula, es decir monta, intromisión, eyaculación y reinicio de la cópula después de la eyaculación.

5.4 Paradigma de la saciedad sexual

Se colocó a las ratas macho sexualmente expertas en los cilindros de observación y después del período de adaptación se añadió una hembra sexualmente receptiva y se les permitió copular sin restricción durante al menos 4 horas, tiempo suficiente para que alcancen la saciedad sexual (Rodríguez-Manzo & Fernández-Guasti, 1994). Posteriormente, a las 24 h se realizó un nuevo registro de la conducta sexual con una nueva hembra y este registro se dio por finalizado de acuerdo con los siguientes criterios:

- Después de que transcurrieron 30 min sin que el macho presentara una primera intromisión.
- Una vez presentada una intromisión, si no eyaculaba dentro de los siguientes 30 min.
- Una vez presentada una eyaculación, si no reiniciaba la cópula después de 30 min.

5.5 Prueba de actividad ambulatoria espontánea

Se realizó esta prueba de actividad para descartar posibles alteraciones motoras en los sujetos de experimentación a los que se les administró algún fármaco, que pudieran interferir con la ejecución de la cópula. Se realizó en cajas de acrílico cuya base está dividida en 12 cuadrantes. Se contabilizó el número de veces que la rata cambió de un cuadrante a otro durante 5 min. Las cajas se limpiaron con una

solución limpiadora (agua, etanol, amoniaco, isopropanol, pinol, extran) para eliminar restos de olores antes de introducir a un nuevo sujeto.

5.6 Cirugía estereotáxica

Para la administración intra-NAcc de fármacos se realizó una cirugía estereotáxica para la implantación bilateral de cánulas guía. Para ello, se anestesió a los sujetos con una mezcla de ketamina (90 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg), y posteriormente se montó la rata en el aparato estereotáxico. Se realizó una incisión en la piel para exponer el cráneo. Una vez expuesto, se localizó la unión entre huesos del cráneo denominada bregma y se determinó la ubicación del NAcc [coordenadas: AP: 1.2 mm; L: +/-1.4 mm] con base en un atlas del cerebro de la rata (Paxinos & Watson, 2009)]. Se hicieron trépanos a través de los cuales se introdujeron las cánulas guía, que se fijaron con acrílico dental y un tornillo que sirvió de anclaje. Después de la cirugía se administró metamizol a los animales para reducir la inflamación y el dolor, y se les permitieron 5 días de recuperación antes de realizar los experimentos. Durante esta etapa los machos se manipularon frecuentemente para habituarlos al manejo y que se pudiera administrar el tratamiento intracerebral sin necesidad de anestesarlos.

5.7 Verificación del sitio de implantación

Una vez finalizadas las pruebas conductuales, a los sujetos implantados se les administró pentobarbital sódico a una dosis de 200 mg/kg, por vía i.p. y se realizó una perfusión intracardiaca con solución salina (NaCl) al 0.9% seguida de formaldehído al 10%. Se extrajeron los cerebros y se colocaron en una solución de formaldehído. Se realizaron cortes coronales con un crióstato y se localizaron las rebanadas que contenían al NAcc, las cuales se colocaron en un portaobjetos y mediante un escáner se obtuvieron imágenes para verificar la ubicación correcta del sitio de implantación de las cánulas.

5.8 Registro del signo del síndrome serotoninérgico de postura de cuerpo aplanado

La hipersensibilidad al agonista del receptor 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, se evaluó a través de la expresión del signo de postura de cuerpo aplanado (PCA), característico del síndrome serotoninérgico (Tricklebank, 1985). La postura de cuerpo aplanado se identifica cuando el animal camina lentamente, con las patas hacia afuera y arrastrando el vientre, casi tocando la superficie del piso. Este signo del síndrome serotoninérgico aparece en las ratas sexualmente saciadas en respuesta a la administración i.p. de 8-OH-DPAT a la dosis de 0.125 mg/kg, dosis que no lo induce en ratas que no están sexualmente saciadas. Se inició el registro de la PCA 15 min después de la administración del fármaco, y posteriormente, se evaluó la presencia o ausencia de la PCA durante 1 min, a intervalos de 5 min, durante un total de 30 min (González-Morales & Rodríguez-Manzo, 2020).

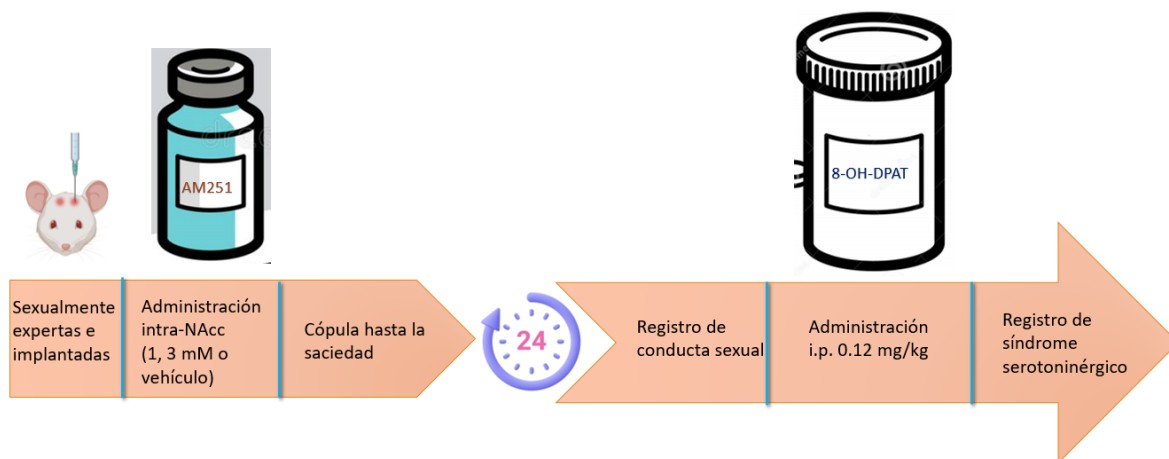
5.9 Análisis estadístico

Se utilizó la prueba F de Fisher para analizar los porcentajes de los animales que presentan las conductas sexuales, la U de Mann-Whitney para la comparación pareada de datos no paramétricos y un ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Dunnett, para el análisis de los parámetros de la cópula y la actividad ambulatoria espontánea. Los datos se presentan como la media \pm error estándar y se consideró significativo el valor de $P < 0.05$. Se utilizó el software Graph Pad Prism versión 8.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1 Objetivo 1

Para determinar el efecto de la administración intra-NAcc del antagonista de CB1R, AM251, sobre el establecimiento de la inhibición sexual y la inducción de la hipersensibilidad a 8-OH-DPAT en ratas macho que copulan hasta la saciedad, se utilizaron 3 grupos independientes de ratas macho sexualmente expertas. Se les administró, por vía intra-NAcc, diferentes concentraciones del antagonista de CB1R AM251 (1-3 mM) o su vehículo, previo a una sesión de cópula hasta la saciedad. A las 24 h post-saciedad se evaluó la conducta sexual de los machos saciados, registrando 2 series copulatorias o 30 min sin actividad sexual. Posteriormente se les administró una dosis de 0.12 mg/kg de 8-OH-DPAT, por vía i.p., y se registró la aparición del signo de postura de cuerpo aplanado durante 15 min. Finalmente se hizo una prueba de actividad ambulatoria espontánea.

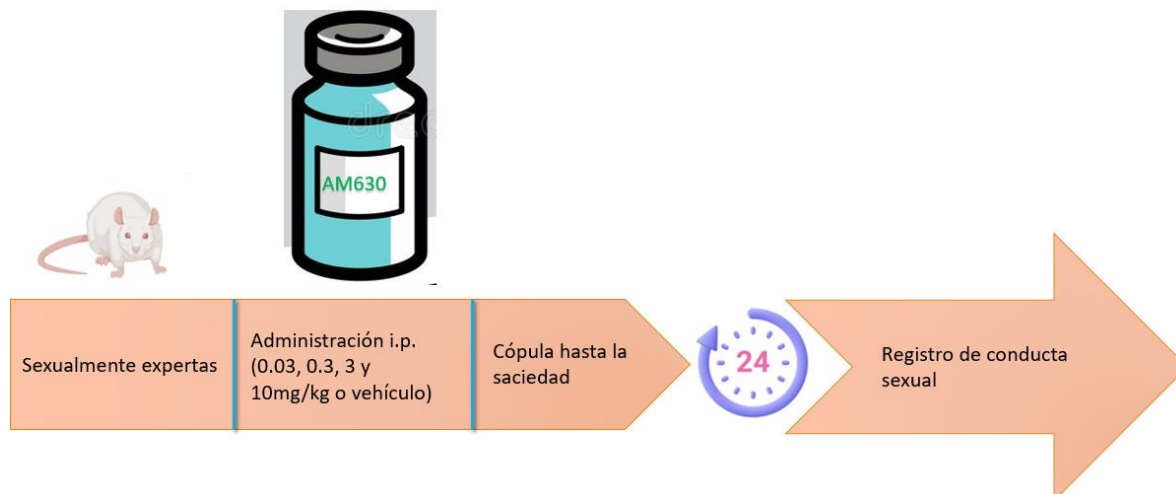


Esquema 1. Diseño experimental del objetivo 1

6.2 Objetivo 2

Para determinar el efecto del bloqueo de CB2R por la administración sistémica del antagonista AM630 durante la cópula hasta la saciedad sobre la inducción de la inhibición sexual de ratas que copulan hasta la saciedad, se utilizaron 5 grupos independientes de ratas macho sexualmente expertas. Se realizó una curva dosis respuesta del efecto de la administración por vía i.p. de AM630 (0.03-10 mg/kg) o

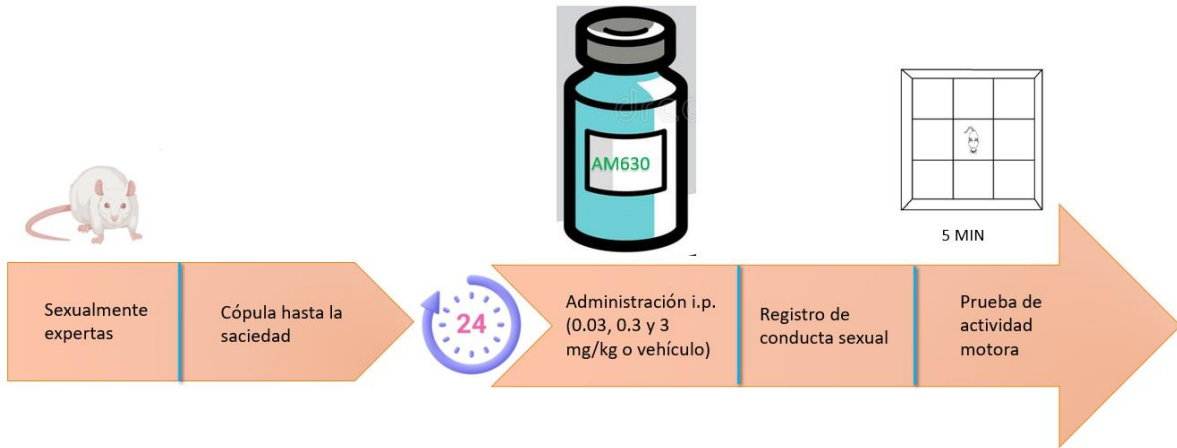
su vehículo, previo a una sesión de cópula hasta la saciedad. A las 24 h post-saciedad se evaluó la conducta sexual de los machos saciados, registrando 2 series copulatorias o 60 min sin actividad sexual.



Esquema 2. Diseño experimental del objetivo 2

6.3 Objetivo 3

Para evaluar el efecto de la administración sistémica del antagonista CB2R, AM630, sobre la conducta sexual de ratas sexualmente saciadas, se utilizaron 4 grupos independientes de ratas macho sexualmente saciadas, a las que se les administró por vía i.p. diferentes dosis de AM630 (0.03-3mg/kg) o su vehículo y se evaluó su conducta sexual registrando 2 series copulatorias o 30 min sin actividad sexual. Posteriormente se les hizo una prueba de actividad ambulatoria espontánea.



Esquema 3. Diseño experimental del objetivo 3.

6.4 Objetivo 4

Para establecer el efecto de la administración intra-NAcc de AEA en ratas macho sexualmente saciadas, se utilizaron 4 grupos independientes de animales sexualmente expertos, implantados bilateralmente con cánulas dirigidas al NAcc. Se sometieron a una sesión de cópula hasta la saciedad y 24 h más tarde se les administraron diferentes dosis de AEA (0.001-0.1 μ g/rata) o su vehículo por vía intra-NAcc. Se registró su conducta sexual a lo largo de 2 series copulatorias o 30 min sin actividad sexual. Posteriormente se hizo una prueba de actividad ambulatoria espontánea.



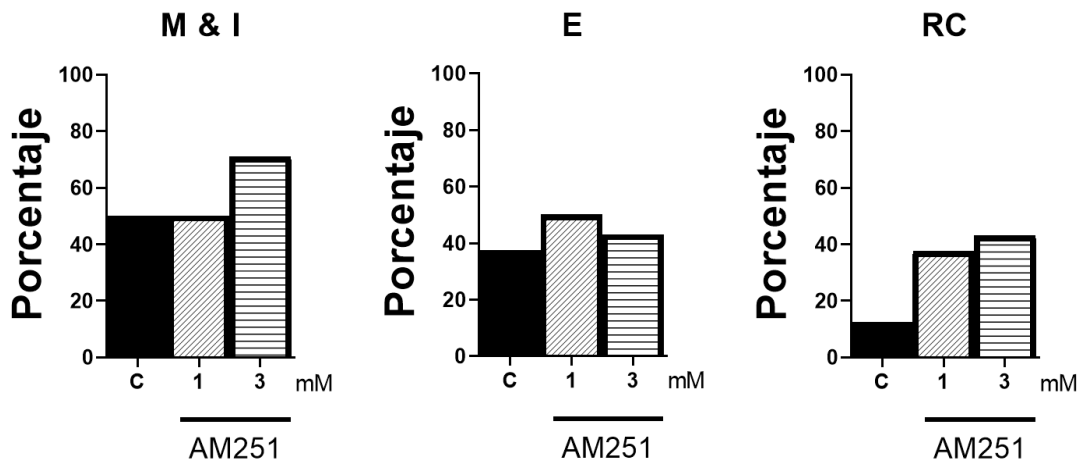
Esquema 4. Diseño experimental del objetivo 4.

7. RESULTADOS

7.1 Efecto del bloqueo de CB1R en el NAcc, sobre la inducción de la inhibición sexual y de la hipersensibilidad a fármacos de ratas que copulan hasta la saciedad

La figura 4A muestra que el pretratamiento intra-NAcc con concentraciones de 1 y 3 mM del antagonista de CB1R AM251 no modificó el porcentaje de ratas sexualmente saciadas que eyaculó y reinició la cópula después de la eyaculación. Por otro lado, la figura 4B muestra que ambas concentraciones de AM251 redujeron significativamente el porcentaje de sujetos que presentó la postura de cuerpo aplanado (PCA) en respuesta a la administración de 8-OH-DPAT (0.12 mg/kg), a las 24 h post-saciedad.

A



B

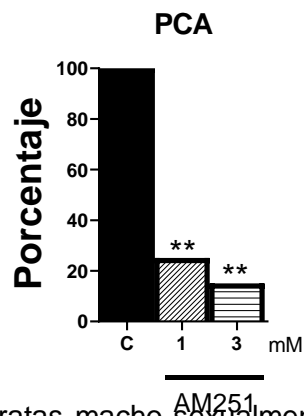


Figura 4. A) Porcentaje de ratas macho sexualmente saciadas, pretratadas con distintas concentraciones de AM251 (1-3 mM) o su vehículo, que presenta las respuestas de monta e intromisión (M&I), eyaculación (E), reinicio de cópula (RC). B) Porcentaje de ratas macho sexualmente saciadas, pretratadas con distintas concentraciones de AM251 (1-3 mM) o su

vehículo, que presenta y el signo de postura de cuerpo aplanado (PCA) en respuesta a la administración de 0.12 mg/kg de 8-OH-DPAT. Prueba F de Fisher: $**P < 0.01$ (n= 8 cada uno).

7.2 Efecto del bloqueo de CB2R sobre la inducción de la inhibición sexual en ratas que copulan hasta la saciedad

En la figura 5 se observa que en las ratas pretratadas con 3 mg/kg del antagonista de CB2R AM630, hubo un aumento significativo en la proporción de animales que presentó montas e intromisiones a las 24 h posteriores a la saciedad. Sin embargo, no hubo diferencias en la proporción de ratas saciadas que eyaculó (E) y reinició la cópula después de la eyaculación (RC) con respecto al grupo control.

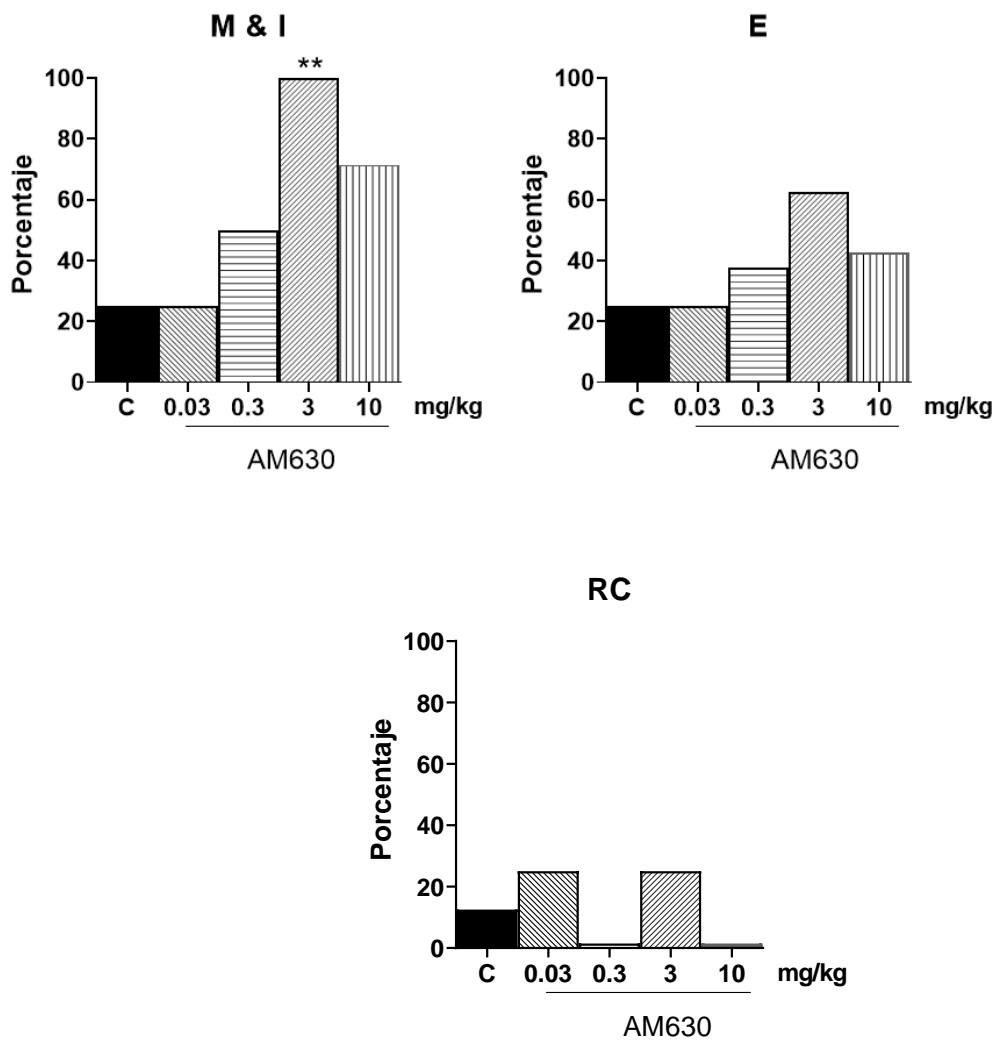


Figura 5. Porcentajes de ratas sexualmente saciadas, pretratadas con distintas dosis de AM630 (0.03-10mg/kg, i.p.), que presentan las respuestas de monta e intromisión (M&I),

eyaculación (E) y reinicio de cópula después de la eyaculación (RC) a las 24 h post-saciedad. Prueba F de Fisher: **P < 0.01 (n=8 cada uno).

7.3 Efecto del bloqueo de CB2R sobre la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas

En la figura 6 podemos observar que la administración sistémica del antagonista CB2R AM630 a ratas sexualmente saciadas aumentó de forma dosis-dependiente la proporción de machos que presentó actividad sexual las 24 h post-saciedad. En particular, con la dosis de 3 mg/kg de AM630 aumentó significativamente el porcentaje de machos saciados que presentó las distintas respuestas. Esta dosis revirtió la saciedad sexual, ya que aumentó significativamente el porcentaje de sujetos que reinició la cópula después de la eyaculación

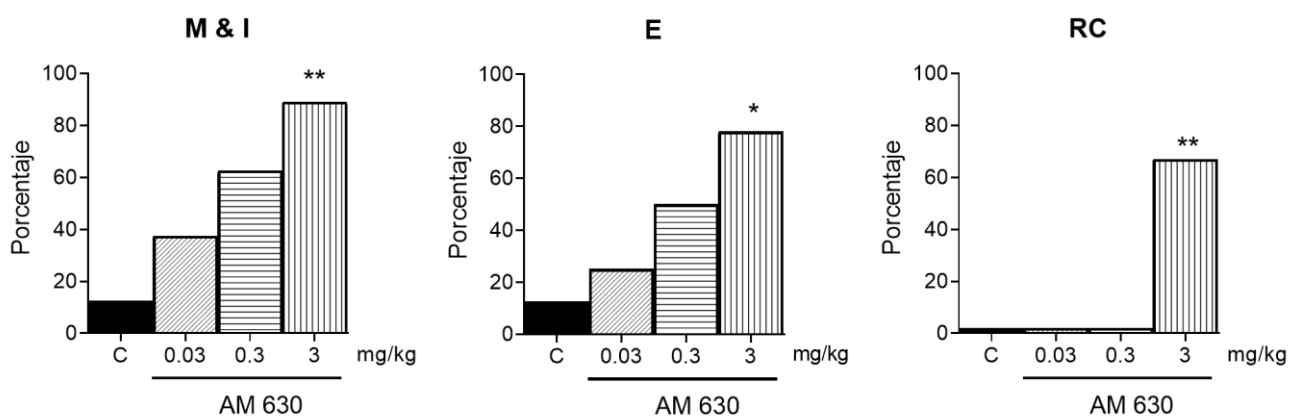


Figura 6. Porcentaje de ratas sexualmente saciadas que presenta las respuestas de monta e intromisión (M&I), de eyaculación (E) y que reinicia la cópula después de la eyaculación (RC) a las 24 h post-saciedad, en respuesta a la administración i.p. de distintas dosis de AM630 (0.03-3mg/kg). Prueba F de Fisher: *P < 0.05; **P < 0.01, n=8-9

En la tabla 1 se muestra que no hubo diferencias en la actividad locomotora de los animales tratados con distintas dosis AM630 por vía sistémica en comparación con aquellos tratados con vehículo.

Tabla 1. Actividad locomotora espontánea de animales sexualmente saciados tratados por vía i.p. con distintas dosis de AM630 o su vehículo.

Dosis (mg/kg)	Media \pm ES del número de cruces entre cuadrantes
C	61.38 \pm 4.16
0.03	58.5 \pm 2.57
0.3	50.88 \pm 5.41
3	68 \pm 3.66

ANOVA de una vía n.s. (n=8-9).

7.4 Efecto de la administración intra-NAcc de AEA sobre la conducta sexual de ratas macho sexualmente saciadas

La Figura 7 muestra que la administración intra-NAcc de 0.01 μ g/rata de AEA incrementó significativamente el porcentaje de sujetos sexualmente saciados que presentó M&I, E y RC, indicando que la AEA revierte la saciedad sexual a esta dosis específica. Una dosis menor careció de efecto mientras que con una dosis mayor el efecto se perdió, lo que confirma el perfil bifásico característico de la AEA.

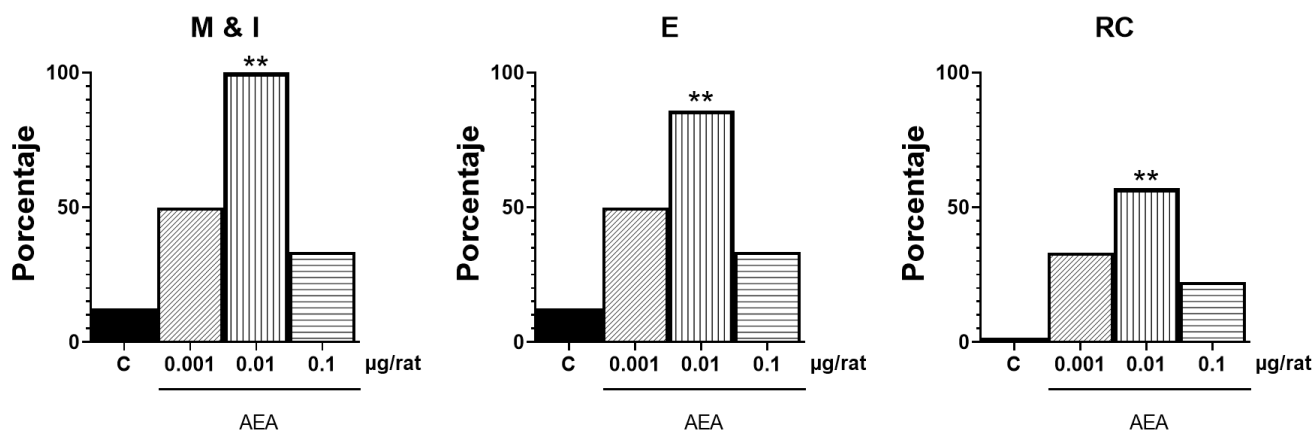


Figura 7. Porcentaje de animales sexualmente saciados que presenta las conductas de monta e intromisión (M&I), eyaculación (E) y reinicio de cópula (RC) en respuesta a la administración intra-NAcc de distintas dosis de AEA (0.001, 0.01 o 1.0 μ g/rata). Prueba F de Fisher: *P < 0.05; **P < 0.01 (n= 7-9).

En la tabla 2 podemos observar que hubo un aumento significativo en la actividad motora de las ratas saciadas tratadas con las concentraciones de 0.001 y 0.01 µg/rata de AEA intra-NAcc en comparación con las tratadas con vehículo.

Tabla 2. Actividad locomotora espontánea de animales sexualmente saciados tratados por vía intra-NAcc con distintas concentraciones de AEA.

Concentración (µg/rata)	Media ± ES del número de cruces entre cuadrantes
C	47 ± 1.32
0.001	57.17 ± 3.76**
0.01	55.33 ± 1.42*
0.1	49.78 ± 1.35

ANOVA de una vía, seguido de Dunnett: *P<0.05, **P<0.01 vs. C, n=7-9.

8. DISCUSIÓN

8.1 Participación de los CB1R del NAcc en las acciones de los eCBs para la inducción de los fenómenos de inhibición sexual e hipersensibilidad a fármacos de ratas sexualmente saciadas

Se ha demostrado que los CB1R participan en el establecimiento de la inhibición sexual y de la hipersensibilidad a fármacos de las ratas que copulan hasta la saciedad. Estudios de nuestro laboratorio muestran que la administración sistémica del antagonista de CB1R, AM251, previene el establecimiento de la inhibición sexual (Canseco-Alba & Rodríguez-Manzo, 2014) y la inducción de la hipersensibilidad tanto al agonista de receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT como al antagonista de adrenoceptores α₂, yohimbina (González-Morales & Rodríguez Manzo, 2020). La prevención de la inhibición sexual y de la hipersensibilidad a 8-OH-DPAT se reproduce por la administración de AM251 directamente en el ATV, lo que demuestra la participación de los CB1R del MSL en la inducción de este fenómeno (González-Morales & Rodríguez Manzo, 2020).

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que el AM251 administrado directamente en el NAcc también previene la inducción de la hipersensibilidad a 8-OH-DPAT mas no el establecimiento de la inhibición sexual de larga duración en ratas que copulan hasta la saciedad. Estos resultados indican que los fenómenos de inhibición sexual y de hipersensibilidad a 8-OH-DPAT no están mediados por el mismo mecanismo. Este resultado es interesante puesto que ambos fenómenos siguen un mismo curso temporal, ya que aparecen a las 24 h post-saciedad, permanecen bien establecidos hasta las 72 h post-saciedad y desaparecen a las 96 h post-saciedad (Rodríguez-Manzo et al., 2011).

Nuestros datos van en el mismo sentido de otras investigaciones. En particular, se ha reportado que durante la cópula hasta la saciedad también hay liberación de opioides endógenos que participan en la inducción de la inhibición sexual de ratas que copulan hasta la saciedad, pero no en la inducción de la hipersensibilidad a fármacos. Así, la administración sistémica del antagonista de receptores opioides tipo μ y δ , naltrexona, previene la aparición de la inhibición sexual mas no la de la hipersensibilidad a 8-OH-DPAT (Garduño-Gutiérrez et al., 2013a). Estos datos apoyan la idea de que la cópula hasta la saciedad produce cambios plásticos en diferentes sistemas cerebrales.

El bloqueo de la hipersensibilidad a fármacos por la administración intra-NAcc de AM251 demuestra por primera vez que hay liberación de eCBs en esta región cerebral durante la cópula hasta la saciedad, que contribuyen a la inducción de este fenómeno. Con este resultado se puede establecer que la cópula intensa, hasta la saciedad, produce liberación de eCBs en el MSL, tanto a nivel de ATV como de NAcc que participan en la inducción de la hipersensibilidad a 8-OH-DPAT a través de activar CB1R. Los CB1R en el NAcc se ha identificado en las FSI (Winters et al., 2012) que inhiben de manera coordinada a las MSNs (Schall et al., 2021), y en las terminales de las aferencias glutamatérgicas provenientes de la corteza prefrontal (Covey & Yocky, 2021).

La transmisión glutamatérgica de estas aferencias al NAcc participa en el fenómeno de sensibilización locomotora (Kalivas, 2004), que consiste en el aumento progresivo en la locomoción producido por administraciones repetidas de

una misma dosis de drogas psicoestimulantes (Stewart & Badiani, 1993). La sensibilización locomotora es un fenómeno que se asemeja a la hipersensibilidad a fármacos que presentan las ratas sexualmente saciadas. La sensibilización locomotora es regulada en el MSL, tanto a nivel del ATV como del NAcc (Vanderschuren & Kalivas, 2000).

Dado que la cópula hasta la saciedad comparte con los psicoestimulantes la capacidad de producir un aumento sostenido en las concentraciones de DA en el NAcc, aunque a escalas diferentes, podría pensarse que algunos de los mecanismos involucrados en la sensibilización locomotora producida por psicoestimulantes jueguen un papel en la inducción de la hipersensibilidad a fármacos de los animales que copulan hasta la saciedad. Los resultados de nuestra investigación no nos permiten proponer un mecanismo de acción por el que los eCBs induzcan la hipersensibilidad a fármacos. Sin embargo, con base en la localización de los CB1R, D1DR y D2DR en el NAcc, se puede sugerir la participación de las MSN-D1 y las MSN-D2 en las acciones de la DA liberada durante la cópula hasta la saciedad, así como de los CB1R de las FSI y de las terminales glutamatérgicas y los CB2R de las terminales DAérgicas y las MSN en las acciones de los eCBs liberados durante la cópula intensa, en la mediación de esta hipersensibilidad.

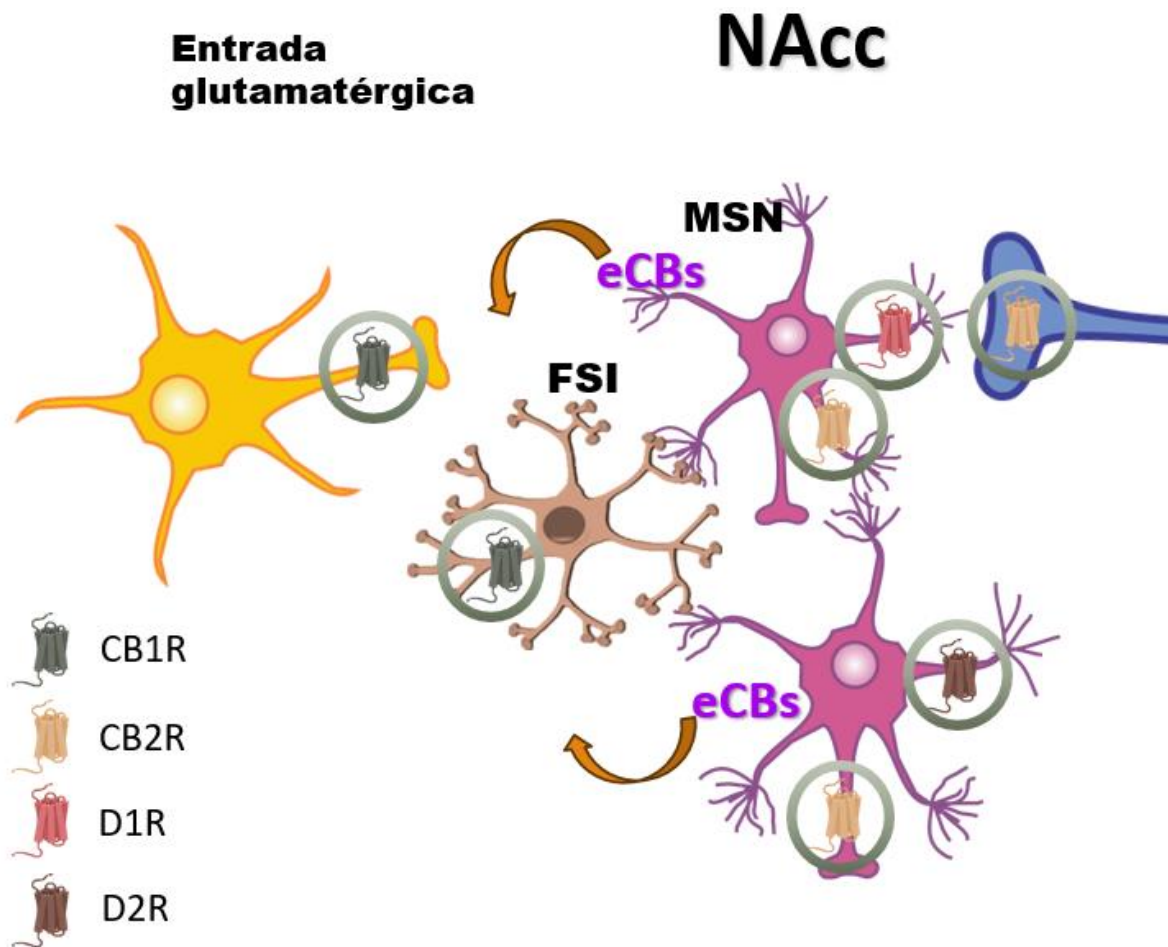


Figura 8. Expresión de receptores CB1, CB2, D1 y D2 en neuronas del NAcc.

Por otro lado, los eCBs liberados en el NAcc no participan en la inducción de la inhibición sexual posterior a la cópula intensa, a diferencia de aquellos liberados en el ATV que sí participan (González-Morales & Rodríguez Manzo, 2020). Este hallazgo no es sorprendente, puesto que estudios previos han mostrado que en los animales sexualmente saciados no hay alteraciones en el funcionamiento de las MSN, que son las que poseen los receptores a DA en el NAcc y, por lo tanto, las que responden a los cambios en la transmisión DAérgica que se presentan en el NAcc de los machos sexualmente saciados (Canseco-Alba et al., 2022). La ausencia de alteraciones en la actividad de las MSN se comprueba al observar que la administración de agonistas DAérgicos directamente en el NAcc restablece la cópula en el 100% de las ratas sexualmente saciadas, que además copulan de

forma tan eficiente como los animales sexualmente expertos (Guadarrama-Bazante & Rodríguez-Manzo, 2019).

8.2 Papel de los CB2R en la inducción y mantenimiento de la inhibición sexual de ratas que copulan hasta la saciedad

Los resultados de este trabajo muestran que el pretratamiento por vía sistémica con el antagonista de CB2R, AM630, no previene el establecimiento de la inhibición sexual de ratas que copulan hasta la saciedad. No obstante, con la dosis intermedia de AM630 probada (3 mg/kg), todos los animales sexualmente saciados presentaron las conductas de monta e intromisión; con la dosis mayor utilizada (10 mg/kg) también se produjo un aumento en estas proporciones, aunque el efecto fue menor. Este resultado sugiere que los CB2R participan en el establecimiento de la inhibición sexual, pero no sobre todos los componentes de la cópula.

Los CB2R fueron identificados recientemente en neuronas del MSL (Ferranti & Foster, 2022), pero su expresión es baja (Zhang et al., 2017; Ferranti & Foster, 2022). Probablemente debido a esta baja expresión, los CB2R juegan sólo un papel parcial en la inducción de la inhibición sexual de las ratas que copulan hasta la saciedad, que se refleja en las respuestas de monta e intromisión, pero no en las de eyaculación y reinicio de cópula. Será necesario profundizar en la investigación del papel de los CB2R del MSL en la expresión de la conducta sexual para confirmar esta propuesta.

Por otro lado, el bloqueo de CB2R en animales sexualmente saciados produjo un aumento, dosis dependiente, en la proporción de machos que mostró las conductas de monta, intromisión y eyaculación que fue significativo a la dosis más alta probada. Además, a esta misma dosis también aumentó significativamente la proporción de ratas saciadas que reinició la cópula después de la eyaculación, lo que se interpreta como la reversión de la inhibición sexual. Este resultado sugiere que los CB2R juegan un papel en el mantenimiento de la inhibición sexual de las ratas sexualmente saciadas. La reversión de la inhibición sexual podría explicarse con base en la localización de los CB2R en el MSL. Se ha descrito que los CB2R se expresan en los somas de las neuronas DAérgicas en el ATV (Ferranti & Foster,

2022), cuya activación inhibe su disparo (Zhang et al., 2017). Al bloquear a estos receptores se cancelaría esta inhibición aumentando la liberación de DA en el NAcc. Por otro lado, también se ha descrito la presencia de CB2R en las terminales DAérgicas en el NAcc, cuya activación inhibe localmente la liberación de DA (Ferranti & Foster, 2022). El bloqueo de estos CB2R evitaría la inhibición local de la liberación de DA. En conjunto, ambos mecanismos darían por resultado un aumento en los niveles de DA en el NAcc, promoviendo así la reversión de la inhibición sexual en las ratas sexualmente saciadas. Es importante resaltar que esta es la primera vez que se describe la participación de CB2R en la expresión de una conducta motivada natural como lo es la conducta sexual. Habrá que determinar en qué regiones del MSL, el ATV y/o el NAcc participan en la reversión de la saciedad sexual.

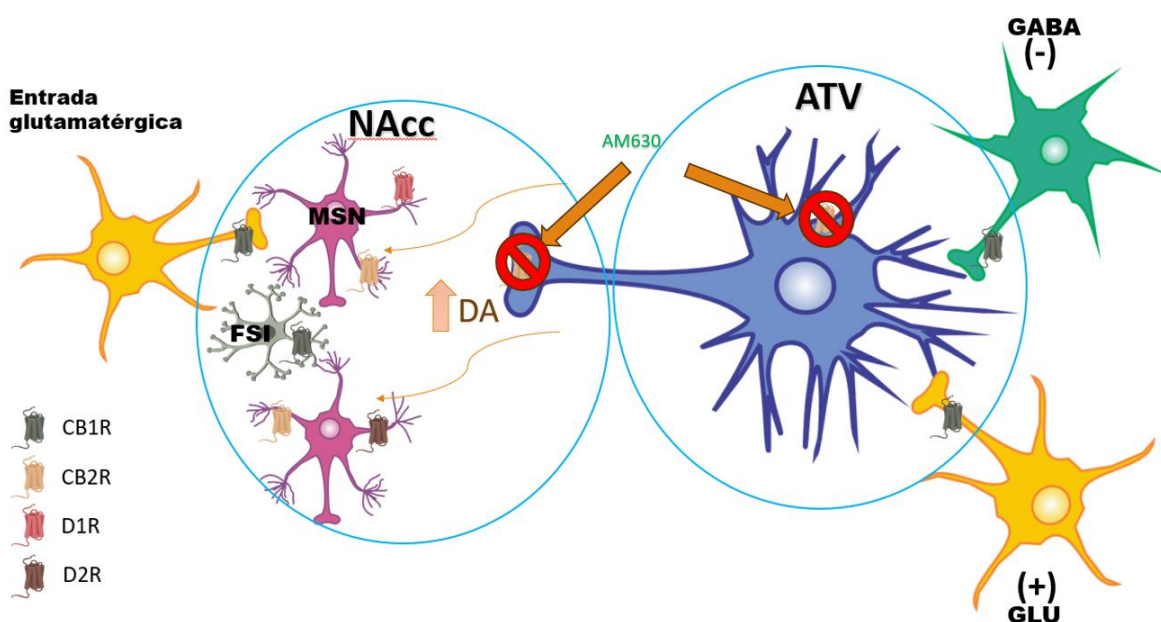


Figura 9. Mecanismo propuesto por el cual el bloqueo de los CB2R facilitaría la reversión de la inhibición sexual, a través de evitar la inhibición de la liberación de DA.

8.3 La activación de CB1R en el NAcc revierte la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas

Se ha reportado que dosis bajas del eCB AEA revierten la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas cuando son administradas tanto por vía sistémica (Canseco-

Alba & Rodríguez-Manzo, 2014) como intra-ATV (Canseco Alba & Rodríguez-Manzo, 2016). Los datos de esta investigación complementan estos resultados al mostrar que la AEA administrada por vía intra-NAcc también revierte la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas. Este resultado permite concluir que la AEA revierte la saciedad sexual en el circuito MSL, al actuar tanto a nivel de ATV como de NAcc.

Nuestros datos sugieren, además, la existencia de distintos mecanismos inhibitorios que son activados por los eCBs durante la cópula hasta la saciedad, uno a nivel del NAcc y otro en el ATV, ya que la activación de CB1R en cada una de estas regiones cerebrales tiene efectos distintos. En el NAcc el mecanismo responsable de esta reversión pudiera deberse a que la AEA se una a los CB1R de las terminales glutamatérgicas que llegan al NAcc inhibiendo la liberación del glutamato, pues se ha demostrado que el bloqueo por vía sistémica de receptores glutamatérgicos revierte la saciedad sexual (Rodríguez-Manzo, 2015). Por otro lado, como se mencionó anteriormente los CB1R también se expresan en las FSI en el NAcc (Winters et al., 2012). Estas interneuronas constituyen el mayor componente inhibitorio sobre la actividad de las MSN (Wright et al., 2017). El bloqueo de la actividad de las FSI por los eCBs a través de la activación de estos CB1R daría como resultado un aumento en la actividad de las MSN que pudiera contribuir a la reversión de la inhibición sexual. En apoyo a esta idea está el hecho de que la administración directa de agonistas DAérgicos en el NAcc que estimulan a las MSN, pues son las únicas neuronas que expresan receptores a DA en el NAcc (Covey & Yocky, 2021), también revierte la saciedad sexual (Guadarrama-Bazante & Rodríguez-Manzo, 2019).

Otro efecto de la administración de AEA directamente en el NAcc fue el incremento en la actividad locomotora de los animales sexualmente saciados. Si bien este aumento solo fue significativo con las concentraciones intermedias de AEA se manifestó con todas las concentraciones probadas. El aumento en la locomoción provocado por la AEA en el NAcc también pudiera explicarse por la activación de los CB1R de las FSI, que al inhibir la liberación de GABA aumentaría la actividad de las MSN. Se sabe que los agonistas DAérgicos que activan a las MSN producen

hiperlocomoción (Violante-Soria et al., 2023). Es importante destacar que el aumento en la locomoción no impidió la reversión de la saciedad sexual.

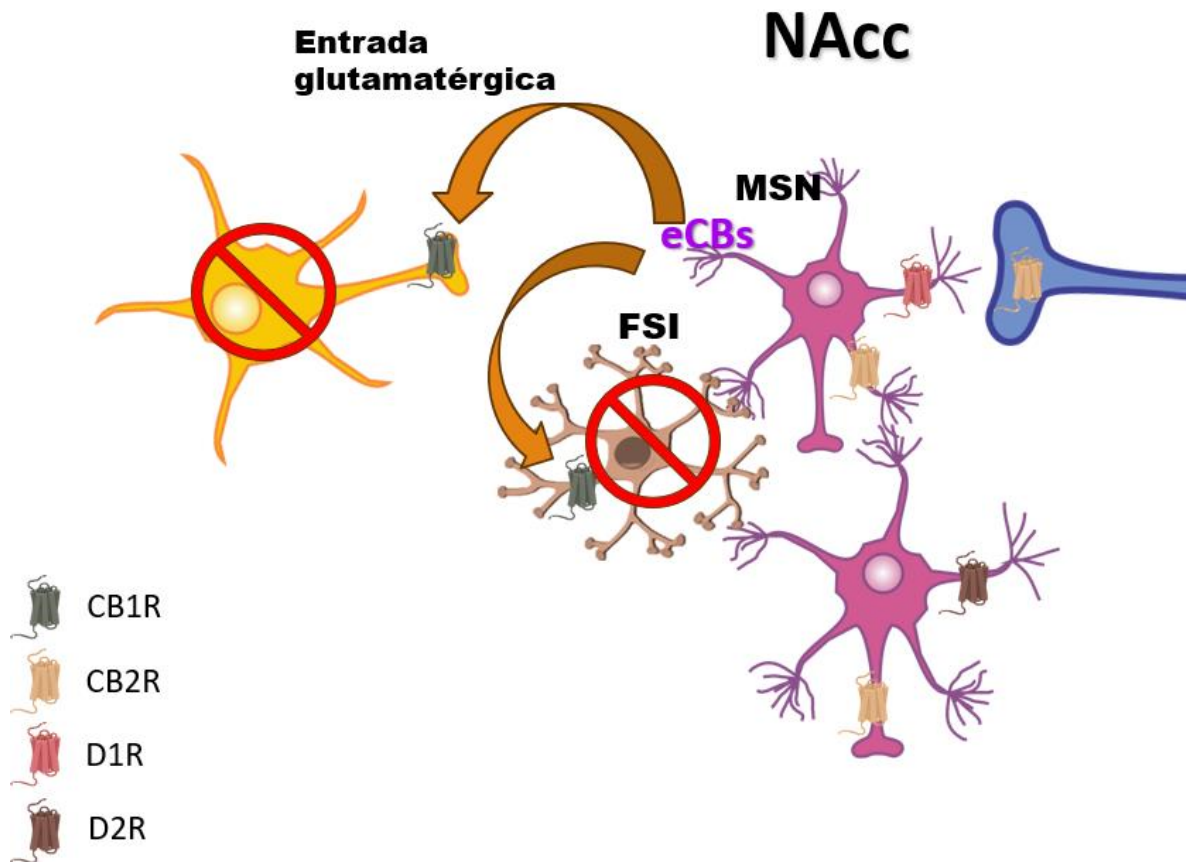


Figura 10. Mecanismo propuesto por el cual los eCBs participarían en el mantenimiento de la inhibición sexual a través de inhibir la liberación de glutamato en las terminales glutamatergicas y a través de inhibir la actividad de las FSIs

De forma interesante se observó que la reversión de la saciedad sexual producida por la AEA en el NAcc se presenta a una dosis específica y que a dosis mayores este efecto se pierde, confirmando el efecto bifásico de la AEA reportado con las otras vías de administración (Canseco-Alba & Rodríguez-Manzo, 2014; Canseco-Alba & Rodríguez-Manzo, 2016) y en otras respuestas conductuales tales como la ansiedad (Rodríguez-Manzo & Canseco-Alba, 2015). Se ha demostrado que los efectos facilitatorios de AEA están mediados por la activación del CB1R, mientras que los efectos inhibitorios de dosis altas de este eCB están mediados por canales TRPV1 (Rodríguez-Manzo & Canseco-Alba, 2015). Por lo tanto, se puede

inferir que la reversión de la saciedad sexual inducida por la administración intra-NAcc de AEA está mediada por CB1R. Con estos resultados puede afirmarse es que en las acciones de la AEA exógena para revertir la saciedad sexual están involucrados mecanismos tanto en el ATV como en el NAcc.

9. CONCLUSIONES

Con base en los resultados de esta investigación se puede concluir que:

- 1) Durante la cópula hasta la saciedad hay liberación de eCBs en el NAcc.
- 2) Los eCBs liberados en el NAcc participan en la inducción de la hipersensibilidad a 8-OH-DPAT a través de activar CB1R, pero no participan a través de este receptor en el establecimiento de la inhibición sexual de ratas que copulan hasta la saciedad.
- 3) Los eCBs liberados durante la cópula intensa activan CB2R que participan en el mantenimiento, pero no en el establecimiento de la inhibición sexual de larga duración de ratas sexualmente saciadas.
- 4) La AEA revierte la inhibición sexual de ratas sexualmente saciadas a través de activar CB1R del NAcc.

10. PERSPECTIVAS

Estudios previos y los resultados de esta investigación muestran que los eCBs participan en la inducción de la hipersensibilidad a 8-OH-DPAT a través de la activación de los CB1R en el ATV y el NAcc. Sería interesante evaluar la participación de estos CB1R en la inducción de la hipersensibilidad a distintos fármacos para establecer si el efecto se generaliza a otros fármacos.

Los resultados de este estudio muestran que el bloqueo de CB2R por vía sistémica revierte la saciedad sexual; sería importante evaluar si este efecto tiene lugar en el MSL y si incluye tanto al ATV como al NAcc.

También sería importante evaluar la participación de los CB2R en el fenómeno de hipersensibilidad generalizada a fármacos de las ratas que copulan hasta la saciedad

Sabiendo que el bloqueo de receptores glutamatérgicos por vía sistémica revierte la saciedad sexual, y dado que tanto el ATV como el NAcc reciben aferencias glutamatérgicas de la corteza prefrontal, sería interesante evaluar la participación del glutamato del ATV y del NAcc en el fenómeno de saciedad sexual.

Datos previos de nuestro laboratorio demuestran que la cópula libera opioides endógenos que activan receptores a opioides MOR y DOR en el ATV. El bloqueo de estos receptores previene el establecimiento de la inhibición sexual y revierte la saciedad sexual. Sería importante evaluar si estos efectos ocurren en el MSL a través de la activación de MOR y DOR del ATV y del NAcc.

11. REFERENCIAS

- Alger BE, Kim J. (2011) Supply and demand for endocannabinoids. *Trends Neurosci* 34,304–315. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.03.003>
- Alger BE. (2002). Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Prog Neurobiol.* 68(4):247-86. doi: 10.1016/s0301-0082(02)00080-1.
- Allichon MC, Ortiz V, Pousinha P, Andrianarivelo A, Petitbon A, Heck N, Trifilieff P, Barik J, Vanhoutte P. (2021). Cell-type-specific adaptations in striatal medium-sized spiny neurons and their roles in behavioral responses to drugs of abuse. *Front Synaptic Neurosci.* 13:799274. doi: 10.3389/fnsyn.2021.799274.
- Balfour ME, Yu L, Coolen LM. (2004). Sexual behavior and sex-associated environmental cues activate the mesolimbic system in male rats. *Neuropsychopharmacology.* 29(4):718-30. doi: 10.1038/sj.npp.1300350
- Beatty JA, Sullivan MA, Morikawa, H., & Wilson, C. J. (2012). Complex autonomous firing patterns of striatal low-threshold spike interneurons. *Journal of Neurophysiology* 108(3): 771–781. doi:10.1152/jn.00283.2012
- Beyer C., Contreras J.L., Morali G., Larsson K. (1981). Effects of castration and sex steroid treatment on the motor copulatory pattern of the rat, *Physiology & Behavior*, 27(4): 727-730. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(81\)90247-X](https://doi.org/10.1016/0031-9384(81)90247-X).
- Cabral GA, Raborn ES, Griffin L, Dennis J, Marciano-Cabral F. (2008). CB2 receptors in the brain: role in central immune function. *Br J Pharmacol.* 153(2):240-51. doi: 10.1038/sj.bjp.0707584..
- Cachope R, Cheer JF. (2014). Local control of striatal dopamine release. *Front Behav Neurosci.* 8:188. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00188.
- 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).* 239(11):3679-3695. doi: 10.1007/s00213-022-06240-3.
- Canseco-Alba A, Rodríguez-Manzo G (2014) Low anandamide doses facilitate male rat sexual behaviour through the activation of CB1 receptors.

Psychopharmacology 231: 4071–4080 <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3547-9>

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 <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2016.11.0048>.

Canseco-Alba A, Rodríguez-Manzo G (2019) Endocannabinoids interact with the dopaminergic system to increase sexual motivation: Lessons from the sexual satiety phenomenon. *Front Behav Neurosci* 13,184 <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00184>

Charles J. Wilson. (2005). The Mechanism of Intrinsic Amplification of Hyperpolarizations and Spontaneous Bursting in Striatal Cholinergic Interneurons, *Neuron*. 45(4):575-85 <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.12.053>.

Contant C, Umbriaco D, Garcia S, Watkins KC, Descarries L. (1996) Ultrastructural characterization of the acetylcholine innervation in adult rat neostriatum. *Neuroscience* 71, 937–47. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00507-2](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00507-2)

Covey DP, Yocky AG. (2021). Endocannabinoid Modulation of Nucleus Accumbens Microcircuitry and Terminal Dopamine Release. *Front Synaptic Neurosci*. 23;13:734975. doi: 10.3389/fnsyn.2021.734975.

Exley R, Cragg SJ. Presynaptic nicotinic receptors: a dynamic and diverse cholinergic filter of striatal dopamine neurotransmission. *Br J Pharmacol*. 2008 Mar;153 Suppl 1(Suppl 1):S283-97. doi: 10.1038/sj.bjp.0707510. Epub 2007 Nov 26. PMID: 18037926; PMCID: PMC2268048.

Fakhoury, M. (2016). Role of the Endocannabinoid System in the Pathophysiology of Schizophrenia. *Molecular Neurobiology*, 54(1), 768–778. doi:10.1007/s12035-016-9697-5

Ferranti AS, Foster DJ (2022). Cannabinoid type-2 receptors: An emerging target for regulating schizophrenia-relevant brain circuits. *Front Neurosci*. 2022 16: 925792. doi: 10.3389/fnins.2022.925792.

- Foster DJ, Wilson JM, Remke DH, Mahmood MS, Uddin MJ, Wess J. et al. (2016). Antipsychotic-like effects of M4 positive allosteric modulators are mediated by CB2 receptor-dependent inhibition of dopamine release. *Neuron* 91, 1244–1252. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.08.017>
- Freund TF, Katona I, Piomelli D. (2003). Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev.* 83(3):1017-66. doi: 10.1152/physrev.00004.2003.
- Garduño-Gutiérrez R, Guadarrama-Bazante L, León-Olea M, Rodríguez-Manzo, G. (2013a). Endogenous opioids mediate the sexual inhibition, but not the drug hypersensitivity induced by sexual satiation in male rats. *Behav. Neurosci.* 127:458-464. <http://dx.doi.org/10.1037/a0032332>.
- 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 opioid receptor antagonists on copulation of sexually experienced and sexually exhausted male rats. *Behav Brain Res* 256: 64-71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2013.07.056>
- Garduño-Gutiérrez R, León-Olea M, Rodríguez-Manzo G. (2013c): 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* 154122-32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2013.10.015>
- Girault, JA. (2012). Integrating Neurotransmission in Striatal Medium Spiny Neurons. In: Kreutz, M., Sala, C. (eds) *Synaptic Plasticity. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, Vienna. 970. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0932-8_18
- González-Morales E, Rodríguez-Manzo G. (2020). Corrigendum to "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, 12510]. *Behav Brain Res.* May 15;385:112572. doi: 10.1016/j.bbr.2020.112572. Erratum for: *Behav Brain Res.* 2020 Apr 6;383:112510.

- Gorzalka BB, Morrish AC, Hill MN. (2008) Endocannabinoid modulation of male rat sexual behavior. *Psychopharmacology*.198(4):479-86. doi: 10.1007/s00213-007-0901-1.
- Grace AA, Floresco SB, Goto Y, Lodge DJ (2007) Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends Neurosci* 30: 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.003>
- Guadarrama-Bazante IL, Rodríguez-Manzo G. (2019). Nucleus accumbens dopamine increases sexual motivation in sexually satiated male rats. *Psychopharmacology*. 236(4):1303-1312. doi: 10.1007/s00213-018-5142-y.
- Guadarrama-Bazante IL, Canseco-Alba A, Rodríguez-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. <http://dx.doi.org/10.1097/FBP.0000000000000086>
- Hang, HY, Gao M, Liu QR, Bi GH, Li X, Yang HJ, et al. (2014). Cannabinoid CB2 receptors modulate midbrain dopamine neuronal activity and dopamine-related behavior in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E5007–E5015
- Heijkoop R, Huijgens PT, Snoeren EMS. (2017) Assessment of sexual behavior in rats: The potentials and pitfalls. *Behav Brain Res*. doi: 10.1016/j.bbr.2017.10.029.
- Hillard, CJ. (2000). Biochemistry and pharmacology of the endocannabinoids arachidonylethanolamide and 2-arachidonylglycerol. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 61(1-2), 3–18. doi:10.1016/s0090-6980(00)00051-4
- Holly EN, Davatolhagh MF, España RA, Fuccillo MV. (2021) Striatal low-threshold spiking interneurons locally gate dopamine. *Curr Biol*. 31(18):4139-4147.e6. doi: 10.1016/j.cub.2021.06.081.
- Hull, E. M., & Rodríguez-Manzo, G. (2017), Male Sexual Behavior, In Donald W. Pfaff, Marian Joëls, (Eds.), *Hormones, Brain and Behavior* (Third Edition) (pp. 1-57), Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803592-4.00001-8>.
- Ikemoto S. (2010). Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: a neurobiological theory. *Neurosci Biobehav Rev*. 35(2):129-50. doi: 10.1016/j.neubiorev.2010.02.001.

- Ikemoto S. (2007). Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res Rev.* Nov;56(1):27-78. doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.05.004.
- Kaczocha M, Haj-Dahmane S. (2022). Mechanisms of endocannabinoid transport in the brain. *Br J Pharmacol.* 179: 4300-4310. doi: 10.1111/bph.15469.
- Kalivas PW. (2004) Glutamate systems in cocaine addiction. *Curr Opin Pharmacol.* 4(1):23-9. doi: 10.1016/j.coph.2003.11.002.
- Kelley AE, Berridge KC (2002) The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J Neurosci* 22: 3306-3311. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-09-03306.2002>
- López-Moreno JA, González-Cuevas G, Moreno G, Navarro M. (2008). The pharmacology of the endocannabinoid system: functional and structural interactions with other neurotransmitter systems and their repercussions in behavioral addiction. *Addict Biol.* 13(2):160-87. doi: 10.1111/j.1369-1600.2008.00105.x.
- Martínez-Mota L, López-Rubalcava C, Rodríguez-Manzo G. (2005). Ejaculation induces long-lasting behavioural changes in male rats in the forced swimming test: evidence for an increased sensitivity to the antidepressant desipramine. *Brain Res Bull* 65: 323–329.
- Melis, M., Pistis, M., Perra, S., Muntoni, A. L., Pillolla, G., & Gessa, G. L. (2004). Endocannabinoids mediate presynaptic inhibition of glutamatergic transmission in rat ventral tegmental area dopamine neurons through activation of CB1 receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(1):53–62. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4503-03.2004>
- Meredith, G. E. (1999). The synaptic framework for chemical signaling in nucleus accumbens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 877, 140–156. doi: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb09266.x
- Nelson AB, Bussert TG, Kreitzer AC, Seal RP. (2014). Striatal cholinergic neurotransmission requires VGLUT3. *J Neurosci.* 2014 Jun 25;34(26):8772-7. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0901-14.2014.

- Pertwee RG. (2015). Endocannabinoids and their pharmacological actions. *Handb Exp Pharmacol* 231: 1–37. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20825-1_1
- Pfaus JG, Damsma G, Nomikos GG, Wenkstern DG, Blaha CD, Phillips AG, Fibiger HC (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](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91309-5)
- Pietr M, Kozela E, Levy R, Rimmerman N, Lin YH, Stella N, Vogel Z, Juknat A. (2009) Differential changes in GPR55 during microglial cell activation. *FEBS Lett.* 18;583(12):2071-6. doi: 10.1016/j.febslet.2009.05.028.
- Robbe, D., Bockaert, J., & Manzoni, O. J. (2002). Metabotropic glutamate receptor 2/3-dependent long-term depression in the nucleus accumbens is blocked in morphine withdrawn mice. *The European journal of neuroscience*, 16(11), 2231–2235. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02273.x>
- Rodríguez-Manzo G, Canseco-Alba A. (2015) Biphasic effects of anandamide on behavioural responses: emphasis on copulatory behaviour. *Behav Pharmacol.* Sep;26(6):607-15. doi: 10.1097/FBP.0000000000000154.
- 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). Opioid antagonists and the sexual satiation phenomenon. *Psychopharmacology (Berl)* 122:131-6.
- 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.* 18;13:701290. doi: 10.3389/fnsyn.2021.701290.
- Rodríguez-Manzo G, Guadarrama-Bazante 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: 253-270. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2010.09.014>

- 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. (2015). Glutamatergic transmission is involved in the long lasting sexual inhibition of sexually exhausted male rats. *Pharmacol Biochem Behav* 131: 64-70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2015.02.002>
- Rodríguez-Manzo, G. and Canseco-Alba, A. (2015). Biphasic effects of anandamide on behavioural responses: emphasis on copulatory behaviour. *Behav Pharmacol* 26:607–615. <http://dx.doi.org/10.1097/FBP.0000000000000154>
- 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2016.11.041>
- Sakae DY, Marti F, Lecca S, Vorspan F, Martín-García E, Morel LJ, Henrion A, Gutiérrez-Cuesta J, Besnard A, Heck N, Herzog E, Bolte S, Prado VF, Prado MA, Bellivier F, Eap CB, Crettol S, Vanhoutte P, Caboche J, Gratton A, Moquin L, Giros B, Maldonado R, Daumas S, Mameli M, Jamain S, El Mestikawy S. (2015). The absence of VGLUT3 predisposes to cocaine abuse by increasing dopamine and glutamate signaling in the nucleus accumbens. *Mol Psychiatry*. 20(11):1448-59. doi: 10.1038/mp.2015.104.
- Sato, A, Sasaoka, T, Nishijo, T, & Momiyama, T. (2014). GABAergic synaptic transmission onto striatal cholinergic interneurons in dopamine D2 receptor knock-out mice. *Neuroscience*, 263:138–147. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.01.010
- Schall TA, Wright WJ, Dong Y. (2020). Nucleus accumbens fast-spiking interneurons in motivational and addictive behaviors. *Mol Psychiatry*. 2021 Jan;26(1):234-246. doi: 10.1038/s41380-020-0683-y.
- Smiley JF, Levey AI, & Mesulam MM. (1999). m2 Muscarinic receptor immunolocalization in cholinergic cells of the monkey basal forebrain and striatum. *Neuroscience*, 90(3), 803–814. doi:10.1016/s0306-4522(98)00527-2
- Stewart J, Badiani A (1993) Tolerance and sensitization to the behavioral effects of drugs. *Behav Pharmacol* 4:289–312

- Szabo B, Siemes S, Wallmichrath I. (2002). Inhibition of GABAergic neurotransmission in the ventral tegmental area by cannabinoids. *The European journal of neuroscience*, 15(12), 2057–2061. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02041.x>
- Tepper James M., Koós Tibor, Ibanez-Sandoval Osvaldo, Tecuapetla Fatuel, Faust Thomas W., Assous Maxime. (2018). Heterogeneity and Diversity of Striatal GABAergic Interneurons. *Frontiers in Neuroanatomy*, 12. 10.3389/fnana.2018.00091,
- Tricklebank MD. (1985). The behavioural response to 5-HT receptor agonists and subtypes of the central 5-HT receptor. *Trends Pharmacol. Sci.*, 6:403-407, 10.1016/0165-6147(85)90191-9
- Vanderschuren LJ, Kalivas PW. (2000). Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology*. 151(2-3):99-120. doi: 10.1007/s002130000493.
- Violante-Soria V, Cruz SL & Rodríguez-Manzo G. (2023). Sexual satiety modifies methamphetamine-induced locomotor and rewarding effects and dopamine-related protein levels in the striatum of male rats. *Psychopharmacology* 240, 797–812 <https://doi.org/10.1007/s00213-023-06322-w>
- Wilson RI, Nicoll RA (2002) Endocannabinoid signaling in the brain. *Science*, 296(5568):678-82. doi: 10.1126/science.1063545.
- Winters BD, et al. (2012). Cannabinoid receptor 1-expressing neurons in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci*;109:E2717–2725. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206303109>
- Winters BD, Krüger JM, Huang X, Gallaher ZR, Ishikawa M, Czaja K, Krueger JM, Huang YH, Schlüter OM, Dong Y. (2012). Cannabinoid receptor 1-expressing neurons in the nucleus accumbens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(40):2717–2725. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206303109>
- Wright WJ, Schlüter OM, Dong Y. (2017). A feedforward inhibitory circuit mediated by CB1-expressing fast-spiking interneurons in the nucleus accumbens.

Neuropsychopharmacology. 42:1146–56.

<https://doi.org/10.1038/npp.2016.275>

Yan Z, Flores-Hernandez J, Surmeier DJ. (2001). Coordinated expression of muscarinic receptor messenger RNAs in striatal medium spiny neurons. *Neuroscience*. 103(4):1017-24. doi: 10.1016/s0306-4522(01)00039-2.

Zhang HY, De Biase L, Chandra R, Shen H, Liu QR, Gardner E, Lobo MK, Xi ZX. (2022). Repeated cocaine administration upregulates CB2 receptor expression in striatal medium-spiny neurons that express dopamine D1 receptors in mice. *Acta Pharmacol Sin*. 43:876-888. doi: 10.1038/s41401-021-00712-6.

Zhang HY, Gao M, Liu QR, Bi GH, Li X, Yang HJ, et al. (2014). Cannabinoid CB2 receptors modulate midbrain dopamine neuronal activity and dopamine-related behavior in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111:E5007–E5015. <https://doi.org/10.1073/pnas.1413210111>

Zhang HY, Gao M, Shen H, Bi GH, Yang HJ, Liu QR, et al. (2017). Expression of functional cannabinoid CB(2) receptor in VTA dopamine neurons in rats. *Addic. Biol.* 22:752–765. <https://doi.org/10.1111/adb.12367>

Zhang, HY, Bi GH, Li X, Li J, Qu H, Zhang SJ, Li CY, Onaivi ES, Gardner EL, Xi ZX, & Liu QR. (2015). Species differences in cannabinoid receptor 2 and receptor responses to cocaine self-administration in mice and rats. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 40(4):1037–1051. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.297>

Zou S, Kumar U. (2018). Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *International journal of molecular sciences*, 19(3):833. <https://doi.org/10.3390/ijms19030833>