



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**“PARTICIPACIÓN DE LA KISSPEPTINA EN LA ACTIVACIÓN DEL
SISTEMA DE RECOMPENSA ASOCIADO CON LA CONDUCTA
SEXUAL EN LA RATA HEMBRA”**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

Q.F.B. JESÚS EDGAR HERNÁNDEZ PONCE

TUTORES PRINCIPALES:

Dra. Marie Christine Aline Bedos
Escuela Nacional de Estudios Superiores Juriquilla, UNAM

Dr. Raúl Gerardo Paredes Guerrero
Instituto de Neurobiología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Rebeca Corona García-Cabral
Instituto de Neurobiología, UNAM

Dr. Francisco Castelán
Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

CD.MX, A 25 DE AGOSTO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: Jesús Edgar Hernández Ponce, cuyo título es: “Participación de la kisspeptina en la activación del sistema de recompensa asociado con la conducta sexual en la rata hembra” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo



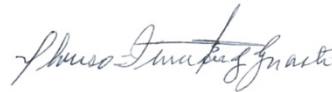
Secretaria

Dra. Marie Aline Christine Bedos



Vocal

Dr. José Alonso Fernández Guasti



Suplente

Dra. Rebeca Corona García-Cabral



Suplente

Dr. Gina Lorena Quirarte



Aprobado por el Comité Académico



Dra. Maricela Luna Muñoz
Coordinadora del Programa Maestría en Ciencias
(Neurobiología)

RESUMEN

La conducta sexual es de carácter innato y es característica para cada especie. En las ratas hembra se caracteriza por elementos motivacionales y copulatorios, además la recompensa es un factor muy importante en la consumación de la cópula. Durante el periodo de receptividad sexual los contactos sexuales se regulan mediante espaciamientos dados por acercamientos y retiradas del macho, modulando así la frecuencia de montas, intromisiones y eyaculaciones. Esta receptividad sexual es altamente plástica a diversos elementos y factores. Entre ellos, se encuentra una neurohormona denominada kisspeptina (Kp), que tiene importantes funciones a nivel reproductivo modulando la pubertad, la gametogénesis, y la conducta sexual. En la presente tesis se evaluó en primer lugar si se lograba inducir un nivel medio de receptividad sexual al disminuir las dosis de hormonas; benzoato de estradiol (E2) y progesterona (P4) administradas en la rata hembra. Posteriormente, para evaluar el efecto de la Kp en la conducta sexual con las concentraciones que se determinaron en el primer experimento (E2 2.5 µg y P4 500 µg) se realizó un segundo experimento para administrar la Kp sola o con P4. Adicionalmente, se administró un antagonista de Kp (P234) en experimentos de cópula regulada con el fin de evaluar la conducta sexual tras el bloqueo del receptor de Kp; el GPR54. Finalmente, en otra serie de experimentos, para evaluar si la Kp participa en la recompensa sexual, se empleó la prueba de condicionamiento de preferencia de lugar (CPL), donde se administraron dos dosis (7 y 14 nmol, 9 y 18 µg respectivamente) con el fin de encontrar cual induce un estado reforzante, así como la administración de P234 en pruebas de CPL con cópula regulada. Nuestros resultados indican que la Kp incrementó la intensidad de lordosis comparado con el tratamiento control de P4 y E2, y que este efecto fue bloqueado por el P234 obteniendo una intensidad de lordosis mayor al grupo de E2. Además, se encontró que ambas dosis administradas de Kp incrementaron el tiempo que los sujetos pasan en el compartimento reforzado, y que el P234 bloquea el estado afectivo positivo inducido por la cópula regulada. Con estos datos concluimos que la Kp juega un papel muy importante en la receptividad sexual y en los estados afectivos positivos asociados a la conducta sexual en la rata hembra.

ABSTRACT

Sexual behavior is innate and characteristic for each species. In female rats it is characterized by motivational and copulatory elements, in addition the reward is a very important factor in the consummation of copulation. During the period of sexual receptivity, sexual contacts are regulated by spacing given by approaches and withdrawals of the male, thus modulating the frequency of mounts, intromissions and ejaculations (pacing). This sexual receptivity is highly plastic to various elements and factors. Among them is a neurohormone called kisspeptin (Kp), which has important functions at reproductive level, modulating puberty, gametogenesis, and sexual behavior. In this thesis, it was firstly evaluated whether it was possible to induce a medium level of sexual receptivity by reducing the doses of hormones; estradiol benzoate (E2) and progesterone (P4) administered to the female rat. Subsequently, to evaluate the effect of Kp on sexual behavior with the concentrations determined in the first experiment (E2 2.5 μg and P4 500 μg), a second experiment was carried out to administer Kp alone or with P4. Additionally, a Kp antagonist (P234) was administered in pacing experiments in order to assess sexual behavior after the blockade of Kp receptor (GPR54). Finally, in another series of experiments, to evaluate whether Kp participates in sexual reward, the place preference conditioning test (CPL) was used, where two doses were administered (7 and 14 nmol, 9 and 18 μg , respectively) in order to find which one induces a reinforcing state, as well as the administration of P234 in CPL tests with pacing. Our results indicate that Kp increased the intensity of lordosis compared to the control treatment of P4 and E2, and that this effect was blocked by P234, obtaining a greater intensity of lordosis than the E2 group. Furthermore, it was found that both administered doses of Kp increased the time that subjects spent in the reinforced compartment, and that P234 blocked the positive affective state induced by pacing. With these data we conclude that Kp plays a very important role in sexual receptivity and positive affective states associated with sexual behavior in female rats.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A los miembros de mi comité tutorial

Dra. Marie Christine Aline Bedos
Dr. Raúl Gerardo Paredes Guerrero
Dra. Rebeca Corona García-Cabral
Dr. Francisco Castelán

Por compartir su experiencia conmigo y por darme consejos y motivación a lo largo de estos 2 años de trabajo.

Técnico del laboratorio

MVZ Francisco Javier Camacho Barrios

Bioterio

MVZ. José Martín García Servín
Dra. Alejandra Castilla León
Dra. María A. Carbajo Mata

Unidad de cómputo

Ing. Ramón Martínez, Rosas Alatorre María Eugenia

Unidad de análisis conductual

Dra. Deisy Gasca Martínez

Unidad de Videoconferencia

Lic. Lourdes Lara Ayala

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Instituto de Neurobiología y especialmente al Laboratorio de Plasticidad Cerebral y Conducta Sexual por abrirme las puertas y aceptarme en su equipo de trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado a partir de 1 de agosto de 2019 al 31 de julio de 2021 al Becario No. (CVU): 1003287 para la realización del presente trabajo de investigación.

Financiamiento

DGAPA-UNAM IA207520.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la vida por permitirme culminar esta etapa de mi vida profesional con éxito.

A mi familia; María, Bernardo, Mario, gracias por estar presentes siempre en persona o la distancia, por motivarme y apoyarme más aún cuando tuve COVID y todo se puso complicado.

A la Familia Rentería Velázquez por todo su apoyo incondicional en esta última etapa de mi titulación, por abrirme las puertas de su hogar y por darme tanto de tantas maneras posibles. Paolita, no tengo como agradecerle el que estés conmigo en mis mejores y peores momentos, ahora yo quiero verte triunfar en tu especialidad médica. Te adoro.

Y por supuesto, a la Dra. Marie Bedos, al Dr. Raúl Paredes y demás doctores por haber fungido todo este tiempo como algo más que mis tutores. Marie, merci beaucoup de croire en moi, merci pour toutes les heures de séminaire supplémentaires que vous avez consacrées à cet projet de recherche, et directement à ma croissance professionnelle. Je l'admire beaucoup, je serai toujours endetté avec vous, merci pour vos enseignements, je les porterai haut partout où je vais.

Tabla de contenido

1	MARCO TEÓRICO	10
1.1	Conducta sexual	10
1.1.1	Atractividad	11
1.1.2	Proceptividad	12
1.1.3	Receptividad	12
1.2	Cópula regulada	15
1.2.1	Estados afectivos positivos generados por la cópula	17
1.3	Kisspeptina	20
1.3.1	Origen	20
1.3.2	Función	21
1.3.3	Localización	22
1.3.4	Antagonista de kisspeptina	25
1.3.5	Kisspeptina y conducta sexual	26
2	JUSTIFICACIÓN	29
3	HIPÓTESIS	29
4	OBJETIVOS	29
4.1	OBJETIVO GENERAL	29
4.2	OBJETIVOS PARTICULARES	29
5	MATERIALES Y MÉTODOS	30
5.1	Animales	30
5.2	Fármacos y hormonas	31
5.3	Condicionamiento de Preferencia de Lugar	31
5.4	Medición del reflejo de lordosis	34
5.5	Grupos y tratamientos	35
5.5.1	Experimento 1: Determinación de las dosis de progesterona y E2	35
5.5.2	Experimento 2: Efecto de la kisspeptina sobre la cópula regulada en hembras	36
5.5.3	Experimento 3: Efecto del antagonista a kisspeptina sobre la cópula regulada en hembras	37
5.5.4	Experimento 4: Condicionamiento de preferencia de lugar con kisspeptina	39
5.5.5	Experimento 5: Condicionamiento de preferencia de lugar con P234	39
5.6	Análisis estadístico	39
6	RESULTADOS	40
6.1	Experimento 1: Evaluación de dosis inferiores de E2 y P4	40
6.2	Experimento 2. Efecto de la kisspeptina sobre la cópula regulada por las hembras	41
6.2.1	Experimento 2. Conducta sexual de los machos	43
6.3	Experimento 3. Efecto del antagonista P234 sobre la cópula regulada por hembras	44
6.3.1	Experimento 3. Conducta sexual de los machos	46
6.4	Experimento 4. Condicionamiento de preferencia de lugar con kisspeptina	47
6.5	Experimento 5. Condicionamiento de preferencia de lugar con P234	48

7	<i>DISCUSIÓN</i>	49
8	<i>CONCLUSIONES</i>	56
9.	<i>ANEXOS</i>	57
8.1	Cartel para la Society for Neurosciene 2021	57
8.2	Presentación de trabajo en la AIBIR 2021	58
10.	<i>REFERENCIAS</i>	59

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Página
Figura 1	Fases de la conducta sexual en ratas 11
Figura 2	Activación neuroendócrina del reflejo de lordosis a partir de la señalización de estradiol 13
Figura 3	Activación sistémica integral del reflejo de lordosis 14
Figura 4	Fotografía de la caja de cópula regulada (Pacing) 16
Figura 5	Simplificación de la vía mesocortical dopaminérgica y GABAérgica 18
Figura 6	Participación del sistema opioide en el mecanismo de recompensa 20
Figura 7	Kisspeptina 21
Figura 8	Retrocontrol del estradiol sobre neuronas kisspeptinérgicas en roedores. 23
Figura 9	Fluctuaciones en los niveles séricos de kisspeptina a lo largo del ciclo ovárico 24
Figura 10	Efectos de la administración del antagonista P234 25
Figura 11	Aferencias a las neuronas kisspeptinérgicas de la MeA 27
Figura 12	Caja de condicionamiento de preferencia de lugar 32
Figura 13	Diagrama del condicionamiento de preferencia de lugar 33
Figura 14	Puntaje para la intensidad de lordosis 34
Figura 15	Administración de fármacos durante el Experimento 2 37
Figura 16	Administración de fármacos durante el Experimento 3 38
Figura 17	Evaluación de dosis bajas de E2 y P4 40
Figura 18	Resultados para la evaluación del efecto de kisspeptina sobre la conducta sexual de la hembra (Latencia de regreso y % de salida) 41
Figura 19	Resultados para la evaluación del efecto de kisspeptina sobre la conducta sexual en la rata hembra (Coeficiente e Intensidad de lordosis) 42
Figura 20	Número de eventos con la aplicación de Kisspeptina 43
Figura 21	Resultados para la evaluación del bloqueo de kisspeptina (P234) sobre la conducta sexual de la hembra (Latencia de regreso y % de salida) 44
Figura 22	Resultados para la evaluación del efecto de kisspeptina (P234) sobre la conducta sexual en la rata hembra (Coeficiente e Intensidad de lordosis) 45
Figura 23	Número de eventos con la aplicación de Kisspeptina y su antagonista (P234) 46
Figura 24	Resultados del tiempo en el compartimento reforzado (TCR) con kisspeptina 47
Figura 25	Resultados del tiempo en el compartimento reforzado (TCR) con pacing y P234 48
Tabla 1	Grupos y tratamientos del Experimento 2 36
Tabla 2	Grupos y tratamientos del experimento 3 38

1 MARCO TEÓRICO

1.1 Conducta sexual

Entre los organismos con reproducción sexual, la conducta sexual es de vital importancia ya que favorece la transmisión de caracteres entre generaciones garantizando así la sobrevivencia de las especies. Sin embargo, la conducta sexual *per se* no es indispensable para la sobrevivencia del propio organismo, como si lo es por ejemplo la alimentación o la hidratación. Se ha propuesto que la conducta sexual es meramente motivacional y que su único propósito es la ejecución de la misma, que además resulta ser intrínsecamente muy reforzante (Agmo, 1999).

En los roedores, la conducta sexual tiene una primera fase precopulatoria (motivacional o apetitiva) en la que se presentan acercamientos e intercambio de estímulos tanto visuales como olfativos y feromonales donde la investigación ano-genital es un componente importante. La segunda fase copulatoria (consumatoria) se caracteriza por el despliegue del reflejo de lordosis por parte de la hembra, facilitando la penetración por parte del macho (Acosta-Martinez & Etgen, 2002; Ishii & Touhara, 2019).

En las ratas macho, la fase consumatoria consiste en el despliegue de: Montas (el macho se posa en la parte posterior de la hembra realizando repetidos movimientos pélvicos, después de los cuales se retira lentamente), intromisiones (el macho monta a la hembra y realiza una penetración vaginal desmontando en forma vigorosa) y eyaculación (el macho permanece sobre la hembra un tiempo mayor al de la intromisión y realiza movimientos espasmódicos de los miembros anteriores) (Beach, 1976) como se aprecia en la figura 1.

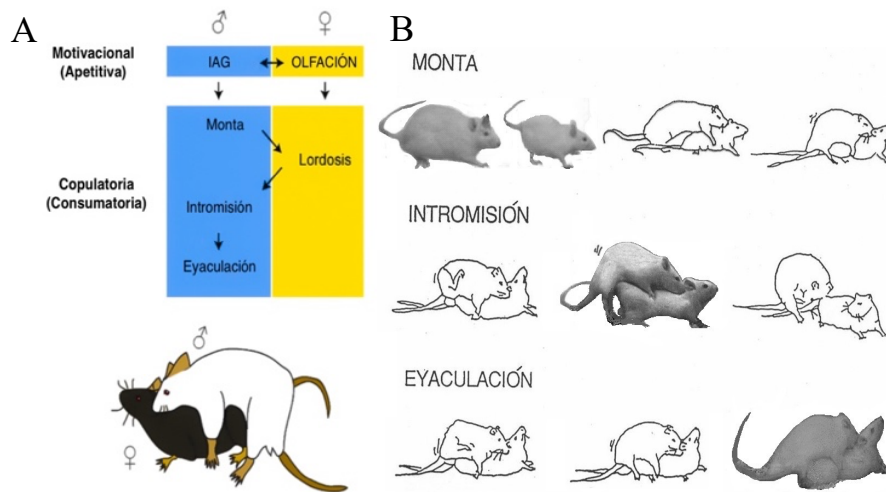


Figura 1. A) Fases de la conducta sexual en ratas (Ishii & Touhara, 2019).
 B) Eventos copulatorios. Modificado de (Slob & van der Werff Ten Bosch, 1998)

En la rata hembra son tres los componentes de la conducta sexual que se pueden identificar: La atractividad en la fase motivacional, y la proceptividad y receptividad en la fase consumatoria, las cuales se describirán a continuación.

1.1.1 Atractividad

Es la capacidad de la hembra para atraer a distancia a un macho para copular. Ésta consiste en señales químicas feromonales y estímulos visuales que el macho recibe e interpreta como potentes estímulos sexuales pues se ha descrito que la sola exposición a olores volátiles de hembras en estro, son suficientes para provocar erecciones sin contacto (NCE) en machos con o sin previa experiencial sexual, incluso sin contacto visual (Sachs, 1997). En ratas la atractividad depende significativamente de la fase del ciclo estral en que se encuentra la hembra, pues ésta es mucho más intensa cuando los niveles de estrógenos se encuentran más elevados lo que a su vez coincide con el periodo de ovulación durante el estro (Hardy, DeBold 1971). Esta simultaneidad de eventos biológicos no es al azar, pues se ha descrito como un mecanismo de la naturaleza para aumentar la probabilidad de apareamiento y por consiguiente de descendencia para perpetuar las especies (Beach, 1976).

1.1.2 Proceptividad

Son conductas apetitivas que muestra la hembra en respuesta a la presencia de un macho las cuales también incrementan la probabilidad de copular. Estas conductas incluyen movimientos en zig-zag, movimientos de acercamiento y alejamiento, pequeños brincoteos, movimientos rápidos de las orejas (Vreeburg & Ooms, 1985), y la emisión de sonidos ultrasónicos que resultan ser estímulos altamente apetitivos para el macho (Hlinak & Madlafousek, 1977). Dentro de la proceptividad pueden distinguirse comportamientos de solicitud, acercamiento y retirada en repetidas ocasiones para incentivar al macho a iniciar la cópula indicando que la hembra está receptiva (Erskine, 1989). Estas conductas proceptivas son dependientes de las hormonas esteroideas gonadales, como la progesterona siendo más efectiva que los estrógenos en la facilitación de conductas proceptivas. Se ha descrito que en ratas ovaclerizadas (OVX) la administración únicamente de progesterona no es suficiente para inducir la proceptividad sino que son necesarias las dos hormonas en conjunto para el despliegue completo y funcional de dichas conductas (Tennent, Smith, & Davidson, 1980).

1.1.3 Receptividad

Es la respuesta conductual de la hembra tras la estimulación física del macho y se caracteriza por el reflejo de lordosis; éste consiste en la dorsiflexión, elevación del tren superior y cabeza, así como un mejor acceso hacia la apertura vaginal moviendo la cola a un lado para facilitar la intromisión del pene del macho (Beach, 1942; Whalen, 1974). Dicho reflejo se encuentra normalmente inhibido por proyecciones del hipotálamo ventromedial (VMH) hacia la médula espinal. Sin embargo, bajo la acción de las hormonas gonadales (E2 y P4) sobre el hipotálamo, se levanta dicha inhibición y se presenta la lordosis (Micevych, 2017).

La activación del reflejo de lordosis comienza a partir de la señalización del E2 ovárico sobre neuronas del núcleo arcuato (ARC) del hipotálamo que expresan receptores de estradiol tipo alfa ($ER\alpha$) activando la liberación del neuropéptido Y (NPY) (Long, Serey, & Sinchak, 2014). EL NPY activa neuronas que secretan β -endorfina que proyectan al área preóptica medial (APOm).

El APOm recibe señales del bulbo olfatorio accesorio (AOB) y del sistema límbico. En una rata no receptiva estas β -endorfinas se encuentran inhibiendo transitoriamente al sistema a través de los receptores a opioides μ (MOR), impidiendo que se lleve a cabo el reflejo de lordosis (Sinchak & Micevych, 2001). Por el contrario, en una rata receptiva un incremento en los niveles de P4 ovárica durante la fase de proestro abole esta inhibición opioide desencadenando la cascada hipotalámica que activa la lordosis (ver figura 2). Por otra parte, la activación del APOm levanta la inhibición GABAérgica sobre el área ventral tegmental (VTA), que al proyectar neuronas dopaminérgicas sobre el núcleo accumbens (NAcc) regula la motivación sexual y activa el sistema de recompensa siendo el disparador del efecto altamente reforzante de la cópula (Micevych, Mermelstein, & Sinchak, 2017).

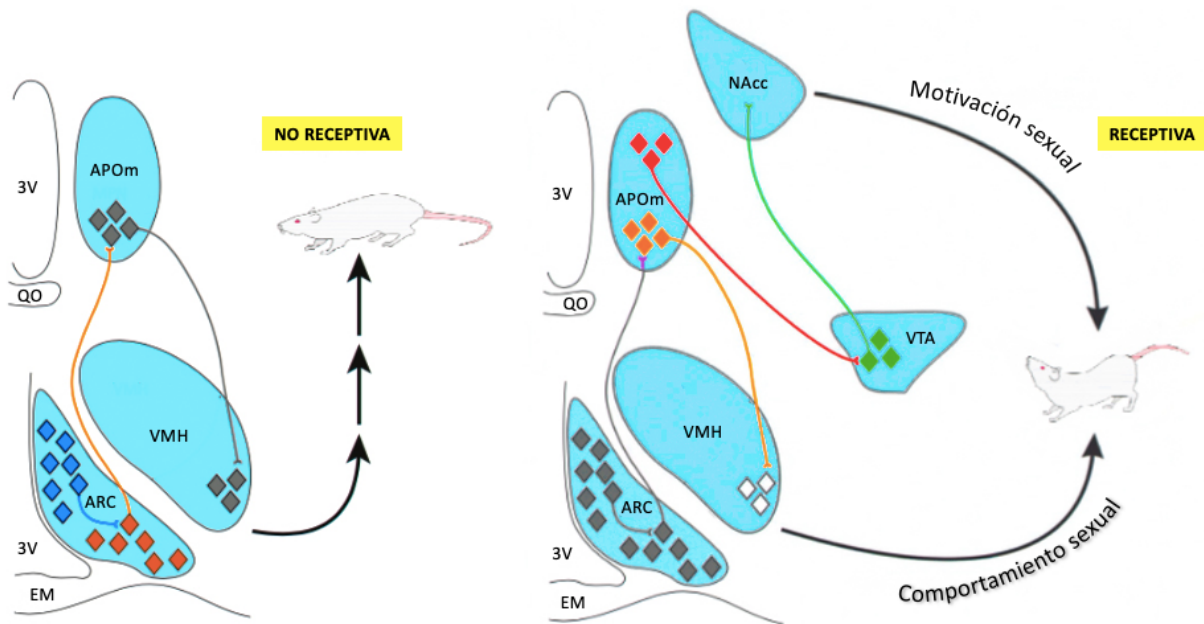


Figura 2. Activación neuroendócrina del reflejo de lordosis a partir de la señalización de estradiol. Neuronas NPY, Neuronas β -endorfinas, Neuronas MOR, Neuronas del VMH, Neuronas GABAérgicas, Neuronas dopaminérgicas, Neuronas inactivas. 3V: 3er Ventrículo, QO: Quiasma Óptico, EM: Eminencia Media. Modificado de (Micevych, 2017; Micevych et al., 2017).

Adicionalmente, la estimulación táctil del macho en los flancos, el perineo y los cuadriles de la hembra durante la monta, se transmiten a través de nervios sensoriales a nivel de las vértebras lumbares y sacras (L1, L2, L5, L6 y S1) en la médula espinal donde se integran con información

descendente. Esto conlleva a la transmisión de un impulso nervioso a los músculos efectores a través de motoneuronas espinosas, culminando con la contracción del músculo erector de la columna vertebral en sus fibras del musculus longissimus y transverso-espinal produciendo así la curvatura característica de la columna vertebral y la activación completa (ver figura 3) del reflejo (Pfaus, 2015).

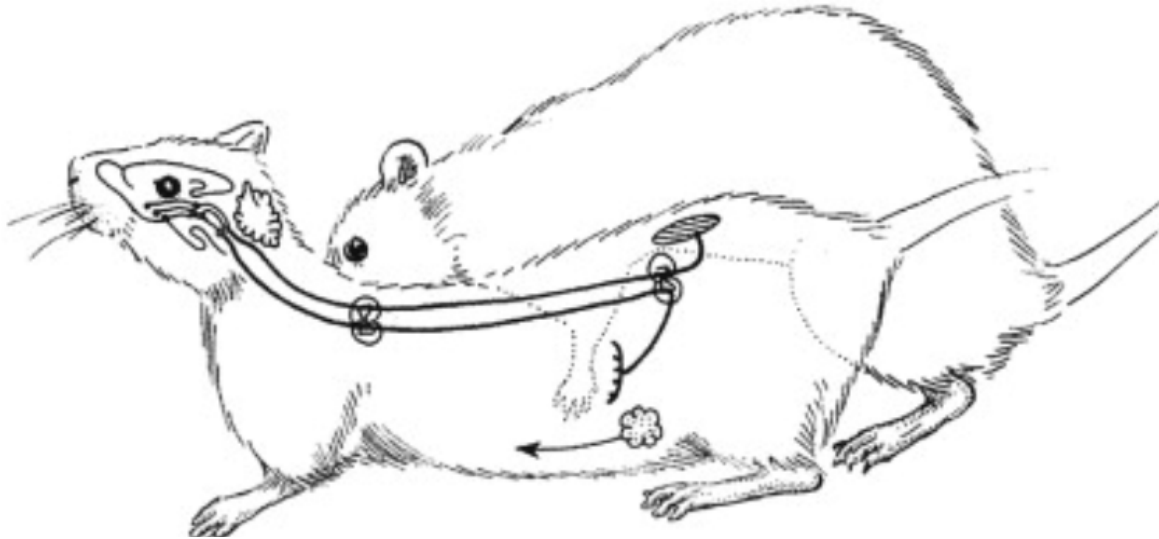


Figura 3. Activación sistémica integral del reflejo de lordosis. Modificado de (Pfaus, 2015).

Luego, durante la intromisión, las sensaciones profundas y táctiles del área genital y del clítoris acentúan el reflejo de lordosis favoreciendo la eyaculación y con ello las probabilidades de fertilización (Gonzalez-Flores et al., 2007; Kow et al., 2007). La intensidad de la lordosis es dependiente de los niveles de E2 y P4 como lo demostraron Hardy y colaboradores en 1971, que administrando dosis incluso de 0.5 μg de E2 y 500 μg de P4 lograban coeficientes de lordosis de más del 60% (Hardy & DeBold, 1971; Tennent et al., 1980). Así mismo se ha descrito que las vías neuronales de activación de la receptividad y la motivación sexual, se encuentran intrínsecamente ligadas (Yoest, Cummings, & Becker, 2019) y son necesarios niveles fisiológicos de E2 y P4 para una activación completa de los sistemas motivacionales de la cópula (Agmo, 1999).

Aunque generalmente se tiene el concepto de que el E2 solo prepara a las hembras para que sean capaces de copular, está reportado que tanto los receptores a estrógeno tipo alfa ($\text{Er}\alpha$) como los

tipo beta ($Er\beta$) se acoplan funcionalmente al receptor metabotrópico a glutamato (mGluR) en múltiples regiones del cerebro, incluido el NAcc, provocando cambios en la neurotransmisión mediante cambios en la estructura dendrítica, lo cual estimula la motivación sexual (Micevych, 2017; Micevych et al., 2017). Por lo que ahora se sabe que el E2 aparte de preparar a la hembra para la cópula también sincroniza la ovulación con la motivación (Tonn Eisinger, Larson, Boulware, Thomas, & Mermelstein, 2018).

Para estudiar de manera seminatural en el laboratorio estos eventos neuroendócrinos así como su modulación por agentes exógenos, se ha desarrollado el modelo experimental de la cópula regulada (pacing), que se describe a continuación.

1.2 Cópula regulada

Se ha demostrado que la interacción sexual en la rata hembra tiene tanto componentes apetitivos como aversivos. En las pruebas de apareamiento convencional en el laboratorio, el macho tiene libre acceso a la hembra, y ésta no puede controlar la interacción del coito resultando así en estímulos aversivos e incluso dolorosos para la hembra debido a la alta frecuencia de las intromisiones. Se ha demostrado que los acercamientos y retiradas constantes con el macho, en la cópula regulada, son importantes para un apareamiento exitoso, es decir que se requiere de un menor número de montas e intromisiones para que el macho eyacule (Camacho, Sandoval, & Paredes, 2004; Paredes, 2009; Paredes & Vazquez, 1999). Por otra parte se ha descrito que incluso en hembras con menor sensibilidad cérvico-vaginal (por aplicación local de lidocaína) se conserva el patrón de cópula regulada (cuantificado como latencias y porcentaje de salidas) (Meerts, Boisvert, Spjut, & Clark, 2010). Para el estudio de la cópula regulada por la hembra en el laboratorio, (Erskine, 1989) realizó los trabajos pioneros en el campo. Ideó un aparato que consistía en una caja de madera (posteriormente acrílico) con aserrín en la base, que contaba con dos cámaras con una división intermedia en la cual había una abertura de tamaño limitado por donde solo podía atravesar la hembra hacia la cámara donde está el macho, (como se muestra en la figura 4) debido a que los machos son notoriamente más grandes. Así, la hembra es la que tiene la posibilidad de regular la frecuencia de la cópula (Paredes & Alonso, 1997). Los aspectos que componen la conducta en la cópula regulada por la hembra involucran acercamientos y

alejamiento del macho cuantificado en el laboratorio por las entradas y salidas que realiza al compartimento del macho, así como las latencias de regreso con el macho tras cada evento copulatorio. Estas conductas aseguran los niveles óptimos de P4 y prolactina necesarios para la preñez (Peirce & Nuttall, 1961). Así mismo se ha demostrado que las hembras que regulan la cópula requieren menos intromisiones para quedar preñadas (Coopersmith & Erskine, 1994).



Figura 4. Fotografía de la caja de cópula regulada (Pacing)

1.2.1 Estados afectivos positivos generados por la cópula

Además de la cópula, algunas conductas evolutivamente preservadas como las que involucran el hambre, la sed, las relaciones sociales y vínculos familiares en algunos mamíferos superiores, son conductas que deben repetirse para la sobrevivencia de las especies. El mecanismo natural que garantiza que estas conductas se repitan consiste en volverlas altamente reforzantes, involucrando el sistema de recompensa y las vías dopaminérgicas.

El condicionamiento de preferencia de lugar (CPL) permite evaluar en roedores si un estímulo aplicado es lo suficientemente reforzante o recompensante para inducir un estado afectivo positivo (EAP), lo que generará un cambio en la preferencia de lugar inicial. Utilizando este condicionamiento nuestro grupo ha demostrado que cuando los sujetos regulan los contactos copulatorios se induce un cambio de preferencia de lugar (Arzate, Portillo, Rodríguez, Corona, & Paredes, 2011; Martínez & Paredes, 2001; Paredes, 2009); Paredes and Vazquez (1999), tanto en machos (Camacho et al., 2004) como en hembras (Paredes & Alonso, 1997).

1.2.1.1 Vías dopaminérgicas

La dopamina (DA) es sintetizada a partir del aminoácido fenilalanina y está involucrada en muchas funciones como son el control motor fino, memoria, aprendizaje, motivación y recompensa. Se han descrito 5 receptores de DA acoplados a proteínas G (D1 a D5), siendo D1 y D5 activadores y D2, D3 y D4 inhibidores de AMP cíclico (Missale, Nash, Robinson, Jaber, & Caron, 1998). Existen dos grandes centros de neuronas dopaminérgicas a nivel del mesencéfalo; la sustancia negra involucrada con el control y regulación de movimientos finos y el área ventral tegmental (VTA, por sus siglas en inglés), involucrado con la atención y la motivación (Brom et al. 2014). El VTA está compuesto por núcleos que mandan sus proyecciones hacia el NAcc en el prosencéfalo en lo que se conoce como la vía mesolímbica. El NAcc manda proyecciones dopaminérgicas hacia la corteza prefrontal (PFC), en la vía mesocortical como se aprecia en la figura 5. Este sistema presenta una actividad basal que es modulada por estímulos reforzantes, los cuales incrementan las tasas de disparo neuronales en esas regiones, proporcionando un valor motivacional al estímulo (Radahmadi, Ramshini, Hosseini, Karimi, & Alaei, 2014).

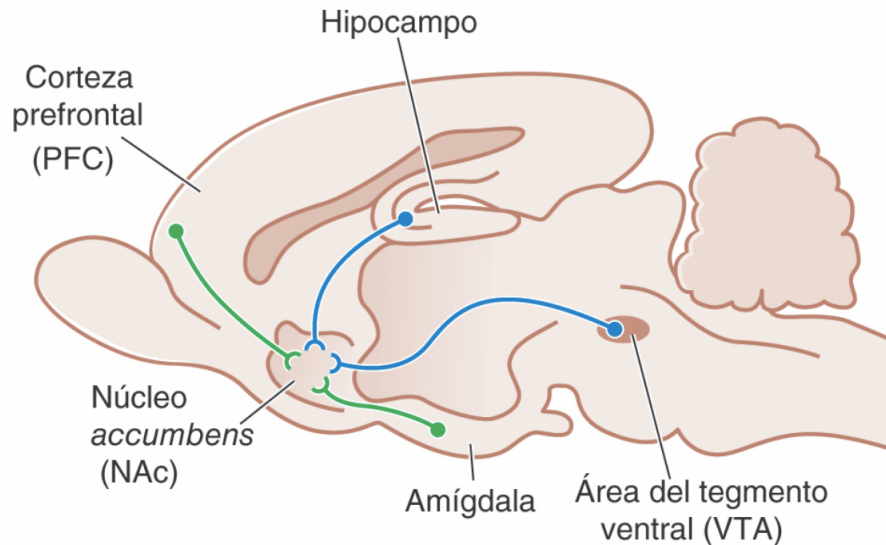


Figura 5. Simplificación de la vía mesocortical dopaminérgica (azul) y GABAérgica (verde), involucradas en motivación y recompensa sexual en el cerebro de la rata. Modificado de (Brunton, 2006).

En experimentos con ratas que pueden auto-estimularse eléctricamente el NAcc a través del condicionamiento operante apretando una palanca, está descrito que pueden llegar a dejar de comer, beber e interactuar socialmente con sus congéneres hasta el punto de morir de inanición y en aislamiento (Olds & Milner, 1955) demostrando así la importante participación del NAcc en la motivación y el placer (Doucette, Khokhar, & Green, 2015).

Este sistema de recompensa de manera fisiológica presenta siempre una actividad tónica espontánea que puede ser modulada hacia el alta o la baja y es a través de neuronas inhibitorias del ácido gamma amino butírico (GABA, por sus siglas en inglés) que las neuronas dopaminérgicas del VTA se encuentran inhibidas hasta la activación por algún reforzador. Se ha identificado que la administración de agonistas dopaminérgicos en roedores hembra incrementa los niveles de lordosis y que en machos la administración de antagonistas de ésta vía se traduce en una inhibición de la excitación y motivación sexual (Fernandez-Fewell & Meredith, 1998). En cambio, la administración de agonistas dopaminérgicos a los receptores D2 en el área preóptica medial (mPOA) y el núcleo arcuato (ARC) produjo un incremento en la lordosis (Foreman & Hall, 1987) y se ha descrito un aumento en los niveles de DA en el NAcc y el estriado de ratas hembra durante la cópula regulada (Mermelstein & Becker, 1995). Adicionalmente se reconoce que la

transmisión de DA hacia el NAcc está asociada con los aspectos anticipatorios y consumatorios de la conducta sexual, siendo importante en la motivación sexual (Pfaus, 1995). Estos cambios en los niveles de DA ocurren principalmente por un aumento en la excitación sexual, pero no propiamente como parte del despliegue de la conducta consumatoria (Tenk, Wilson, Zhang, Pitchers, & Coolen, 2009) lo que sugiere que otros mecanismos como el sistema opioide (Pfaus, 1992) están involucrados en la regulación de la conducta sexual.

1.2.1.2 Sistema opioide

Aparte del bien conocido efecto de analgesia, el sistema opioide también juega un papel muy importante en las vías de recompensa (Paredes, 2014). Se ha descrito que las células GABAérgicas del VTA expresan receptores a opioides μ (MOR). La unión de opioides a sus receptores en esta región abole la inhibición de GABA y por lo tanto favorecen la liberación de dopamina en el NAcc (Acosta-Martinez & Etgen, 2002) como se aprecia en la figura 6. La activación de MOR tiene un efecto positivo sobre la inducción de lordosis durante la cópula, lo que permite suponer que los opioides están involucrados en la activación del sistema de recompensa asociado a la conducta sexual (Pfaus, 1992).

La activación de receptores a opioides tras la administración exógena de morfina induce un estado reforzante evidente y cuantificable por medio del CPL (Paredes & Alonso, 1997). En ratas macho y hembra se ha demostrado que la posibilidad de regular la cópula induce un estado afectivo positivo (EAP) de la misma intensidad que las inyecciones de morfina (Paredes & Alonso, 1997; Teodorov, Camarini, Bernardi, & Felicio, 2014). Además, el CPL inducido por la cópula regulada se bloquea por la administración de naloxona (antagonista de los receptores a opioides) en el mPOA, VMH y amígdala medial (MeA) en la rata hembra (García-Horsman, Agmo, & Paredes, 2008). El papel de los opioides en la cópula se ha descrito por dos mecanismos sinérgicos; por un lado, los efectos reforzantes propiamente de los opioides endógenos (Agmo, 1999) y por otro, la disminución de las consecuencias aversivas por los efectos analgésicos de estos (Paredes & Martinez, 2001).

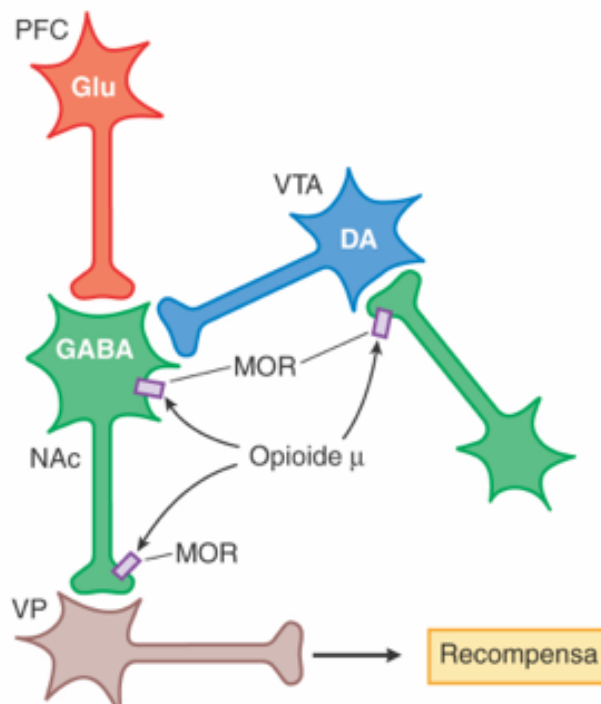


Figura 6. Participación del sistema opioide en el mecanismo de recompensa. El efecto inhibitorio que tienen los opioides en el VTA sobre las neuronas GABAérgicas incrementa la actividad en el pálido ventral (VP) lo que se correlaciona con un estado de refuerzo positivo. Modificado de (Brunton, 2006)

1.3 Kisspeptina

1.3.1 Origen

Identificado hace casi dos décadas como un agente supresor de metástasis en una línea celular de melanoma, se ha descubierto que el gen *KISS1* también tiene un papel fundamental en la reproducción. *KISS1* codifica para la familia de neuropéptidos kisspeptinas como puede apreciarse en la figura 7, las cuales se sintetizan como pre-pro-kisspeptina, un péptido precursor de 145 aminoácidos (aa) que, por proteólisis y amidación, da lugar a la proteína biológicamente activa de 54 aa (Kotani et al., 2001). Además del péptido de 54 aa, se han aislado péptidos de 14, 13 y 10 aa, los cuales tienen la misma actividad biológica. El receptor a kisspeptinas (GPR54 o *KISS1R*) está acoplado a proteínas G y está compuesto de 7 dominios transmembranales (Muir et al., 2001).

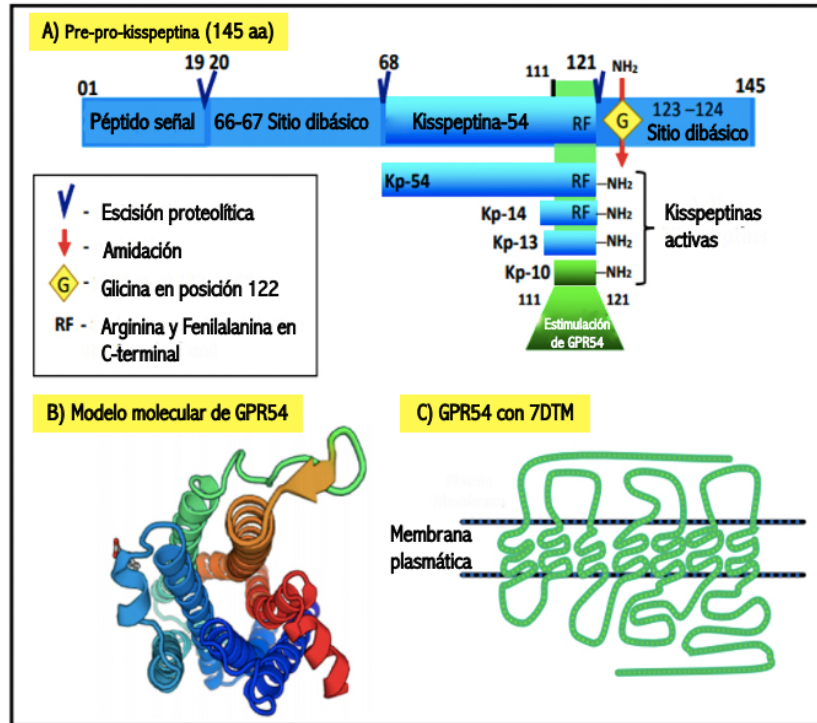


Figura 7. Kisspeptina. **A)** Escisión de la proteína Kisspeptina. **B)** Estructura de GPR54. **C)** GPR54 en la membrana plasmática. Modificado de (Trevisan et al., 2018).

1.3.2 Función

Este neuropeptido actúa en la cima del eje hipotálamo-hipofisis-gónadas, por encima de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH). Se ha descrito la función de Kp/GPR54 en la fisiología reproductiva cuando se describieron casos de hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático (poco o nulo desarrollo de los genitales debido a bajos niveles en hormonas gonadotrópicas) (Seminara et al., 2003) ya sea por interrupción en la unión con su ligando endógeno (Smith, 2005) o como consecuencia de mutaciones en el gen de GPR54 (Cattanach, Iddon, Charlton, Chiappa, & Fink, 1977; Herbison, de Tassigny, Doran, & Colledge, 2010). El importante papel de la kisspeptina sobre las neuronas GnRH se debe, en gran parte, a que el GPR54 se encuentra expresado en cerca del 95% de estas (Kauffman, et al. 2007). La activación de GPR54 por la kisspeptina constituye el estímulo más potente para la liberación de la GnRH, la cual es necesaria para que se inicie el proceso de la pubertad (Pineda, 2010) y la gametogénesis (Skorupskaite, George, & Anderson, 2014; Ulaş Aytürk et al., 2017). Por otra parte, recientemente

se ha recopilado información de otros neurotransmisores, péptidos u hormonas que regulan las diversas funciones de la kisspeptina, como son la proopiomelanocortina (POMC), el NPY, la proteína relacionada con agouti (AgRP), la noradrenalina, el GABA, entre otros (Saedi, Khoradmehr, Mohammad Reza, & Tamadon, 2018).

1.3.3 Localización

En roedores, se han descrito dos principales poblaciones de neuronas kisspeptinérgicas hipotalámicas que reciben retroalimentación tanto positiva (área ventral periventricular; AVPV) como negativa (ARC) a través de la activación de los $ER\alpha$, como se observa en la figura 8, y que posteriormente desencadenan su efecto sobre las neuronas que secretan a la GnRH (Comminos et al., 2016; Dhillon et al., 2005; Semaan, Tolson, & Kauffman, 2013). Las neuronas kisspeptinérgicas localizadas en el ARC coexpresan neurokinina B (NKB) y Dinorfina (conocidas como neuronas KNDy). En estudios electrofisiológicos, se han observado tasas de disparo de manera tónica, irregular o en ráfaga que fluctúan durante el ciclo estral (Alreja, 2013). Se caracterizan por estar ampliamente interconectadas, lo cual favorece su funcionalidad unitaria y por expresar $ER\alpha$ (Herbison et al., 2010).

Además, se ha demostrado que esta población de neuronas kisspeptinérgicas es la generadora de pulsos de la GnRH y regula el patrón pulsátil de la LH tanto en ratas (Li et al., 2009) como en ovejas (Goodman et al., 2013) y cabras (Okamura et al., 2010). También se ha descrito la expresión de receptores a E2 y P4 en áreas con poblaciones de neuronas de kisspeptina como el POA (área preóptica), y la MeA (Lauber, Romano, & Pfaff, 1991; Martini, Pradotto, & Panzica, 2011).

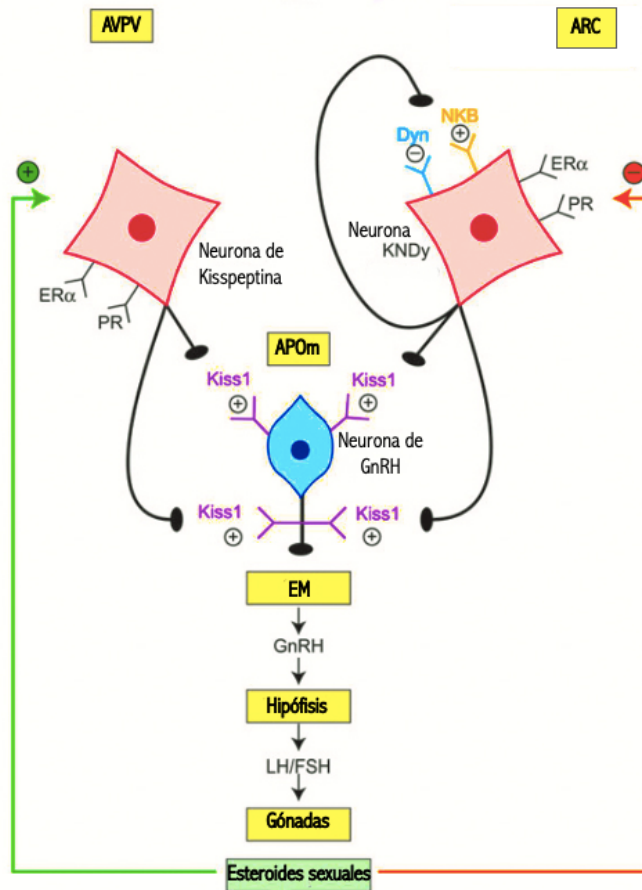
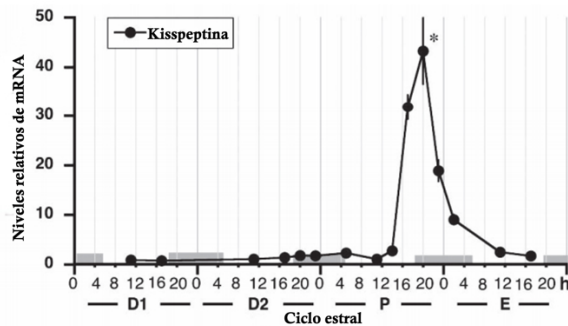


Figura 8. Retrocontrol del estradiol sobre las neuronas kisspeptinérgicas en roedores. El estradiol puede regular negativa (ARC) o positivamente (AVPV) la acción de la kisspeptina que es el principal estímulo de la secreción de GnRH. Modificado de (Skorupskaite et al., 2014).

En el humano existe un dimorfismo sexual en la colocación de mensajeros en estas neuronas. En el hombre las neuronas que expresan kisspeptina en el núcleo infundibular (equivalente al ARC de otras especies) coexpresan NKB, pero escasa dinorfina, mientras en las mujeres, las mismas neuronas expresan kisspeptina, dinorfina y NKB, que se almacenan de forma independiente en vesículas diferenciadas en el interior de las células KNDy (Helena, 2015).

Fuera del hipotálamo, la kisspeptina se expresa también en regiones límbicas tales como la MeA, el hipocampo y el tálamo, tanto en roedores (Yeo, 2016) como en humanos (Muir et al., 2001). También se han descrito fluctuaciones en los niveles séricos de expresión de mRNA de kisspeptina a lo largo del ciclo ovárico como se puede apreciar en la figura 9.

a)



b)

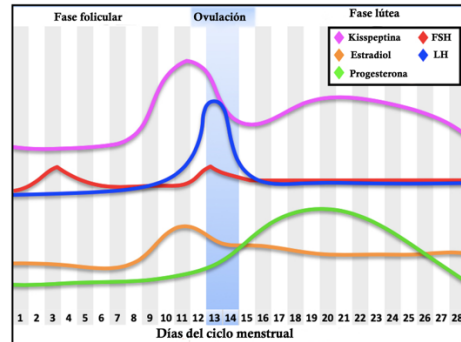


Figura 9. Fluctuaciones en los niveles séricos de kisspeptina a lo largo del ciclo ovárico en **a)** rata (Laoharatchathanin et al. 2015) y en **b)** humano. Adaptado de (Trevisan et al., 2018).

Se ha estudiado el efecto de la kisspeptina en regiones extra-hipotalámicas como en la MeA, que es el primer relevo de señales olfativas y un importante integrador y orquestador de las inervaciones de vasopresina y dopamina de otras áreas (Pineda, Plaisier, Millar, & Ludwig, 2017). La amígdala es un área fuertemente relacionada con funciones sociales y reproductivas, entre otras (regulador de ciclo estral y liberación de la GnRH) (Semaan et al., 2013). De manera interesante, la administración de la kisspeptina en la MeA incrementa la secreción de la LH en ratas hembra (Comminos et al., 2016). También se han reportado niveles altos de expresión de la kisspeptina y de su receptor en diferentes regiones conocidas por su participación en el procesamiento de la recompensa y motivación de conductas reforzantes tales como el VTA, NAcc, la MeA y la sustancia gris periacueductal (Brailoiu & Dun, 2005; Clarkson & Herbison, 2006; Kotani et al., 2001; Muir et al., 2001).

1.3.4 Antagonista de kisspeptina.

Para entender mejor el efecto de la kisspeptina, es muy útil la administración de sustancias antagonistas, con el fin de evaluar qué alteraciones ocurren tras la inhibición total o parcial del receptor, impidiéndose un efecto de la kisspeptina. Se ha reportado la presencia de receptores a kisspeptina en tejidos periféricos como son placenta, hígado, páncreas, riñón, testículos, ovarios, músculo cardíaco y adiposo (Wolfe & Hussain, 2018) así como en áreas cerebrales, donde para bloquearlos se requiere que el antagonista logre atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), (Albers-Wolthers et al., 2017).

El péptido P234 tiene un gran efecto antagonista, sin embargo por si solo tiene bajo índice de penetración de la BHE, por lo que se le adicionó una secuencia de péptido “penetratin” con la cual logra atravesar la BHE. Se ha reportado como uno de sus efectos, el decremento en la amplitud y frecuencia de pulsos de la LH en ovejás ovariectomizadas (Roseweir, 2009) y en ratas macho (Gresham et al., 2016). Además, en ratas hembras se observó que en el grupo administrado con el antagonista se presentó una menor apertura vaginal contra el grupo control a través del tiempo, así como menor peso del útero y de los ovarios (Pineda, 2010) retrasando significativamente el comienzo de la pubertad y la madurez sexual (Roseweir & Millar, 2013) como se muestra en la figura 10.

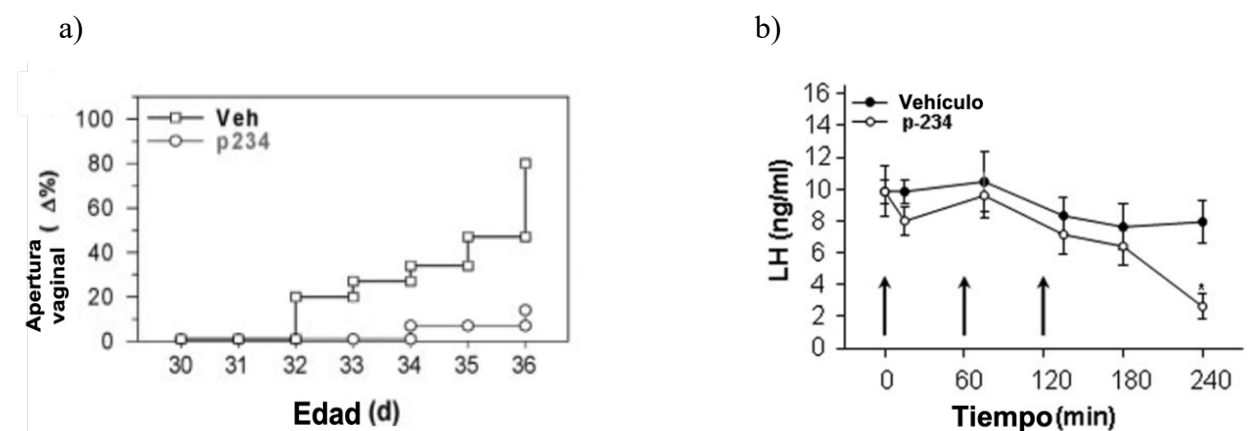


Figura 10. Efectos de la administración del antagonista P234 en a) Retraso de la apertura vaginal (Pineda, 2010). b) Disminución de los niveles de la LH tras tres infusiones de 1 nmol (flechas) en ratas macho castradas. Adaptado de (Roseweir, 2009).

1.3.5 Kisspeptina y conducta sexual

1.3.5.1 *Papel de kisspeptina en el procesamiento de señales olfativas*

En roedores hembra, la preferencia de pareja y conducta sexual dependen de la detección y el procesamiento de señales olfatorias, así como de un adecuado ambiente hormonal que ocurre durante la etapa de estro (fase de ovulación), los cuales están sincronizados para garantizar una reproducción exitosa (Kang, Baum, & Cherry, 2009). Las señales químicas (feromonas) de alto peso molecular secretadas por el macho son detectadas en el órgano vomeronasal (OVN) que tiene proyecciones hacia las células mitrales del bulbo olfatorio accesorio (BOA), las cuales proyectan hacia la amígdala medial (MeA), estas a su vez proyectan tanto al núcleo del lecho de la estría terminal (BNST) como a regiones hipotalámicas (VMH y mPOA) cruciales para el despliegue de la conducta sexual (Kevetter & Winans, 1981). En un estudio realizado en ratas y ratones, Pineda et al. (2017) demostró con marcadores anterogrados y retrogrados que las neuronas kp de la amígdala posterodorsal (MePD) proyectan hacia el BOA pero que también existen cuerpos celulares de neuronas kp en el BOA que proyectan hacia la MePD. Por lo anterior, los autores han postulado que las neuronas kisspeptinérgicas de la MePD juegan un papel crucial en la integración de estas señales olfativas (Pineda et al., 2017). Además otro grupo describió la importancia de las neuronas kisspeptinérgicas en la MeA. En ratones macho tras la exposición a orina de las hembras; estas neuronas median las respuestas del eje reproductivo a través de GABA y glutamato (Aggarwal et al., 2019).

Por otra parte, se ha reportado a través de técnicas de farmacogenética como los receptores modificados activados únicamente por ligandos sintéticos (DREADDs) en la que se permite activar o inactivar poblaciones neuronales selectivamente, que la MeA, estructura ampliamente relacionada con la kisspeptina, regula tanto la expresión del reflejo de lordosis como la preferencia de las hembras por las feromonas de machos sexualmente activos (McCarthy et al., 2017).

Finalmente, se ha observado que las neuronas kisspeptinérgicas de la MeA están en estrecho contacto con procesos de neuronas productoras de tirosin hidroxilasas (TH), las cuales sugieren una posible regulación de la DA sobre éstas. Así mismo, las neuronas kisspeptinérgicas están en contacto con procesos de neuronas que expresan vasopresina, un nonapéptido que junto con la

oxitocina median las conductas sociales y de formación de vínculos (Pineda et al.,2016). La interacción de neuronas de kisspeptina con otras áreas se puede apreciar en la figura 11.

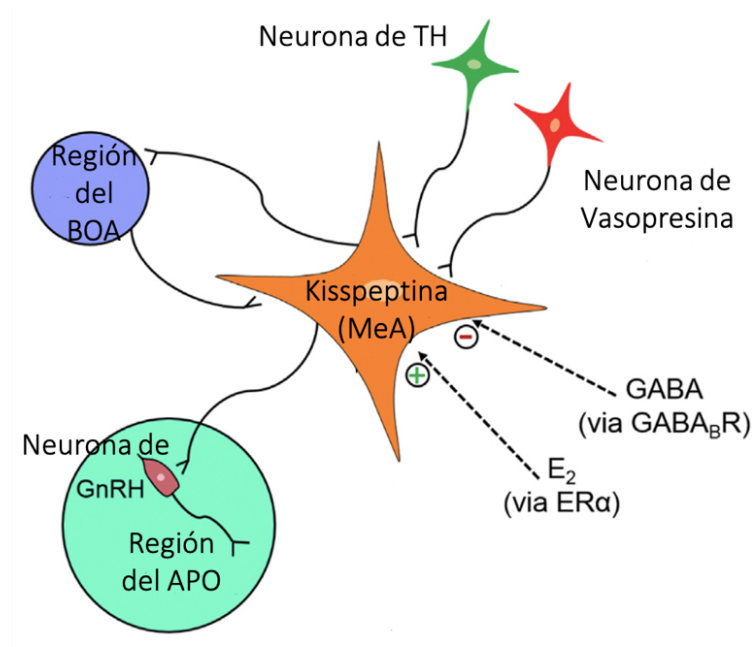


Figura 11. Aferencias a las neuronas kisspeptinérgicas de la MeA. Éste núcleo de neuronas de kisspeptina recibe proyecciones de diferentes áreas que regulan su función. Tomado de (Stephens, 2017).

1.3.5.2 Papel de la kisspeptina en la conducta sexual

La administración directa de la kisspeptina en áreas cerebrales con una importante función en la conducta sexual ha revelado efectos muy interesantes. En el ratón hembra se ha demostrado que la kisspeptina administrada en el AVPV incrementa el coeficiente de lordosis (porcentaje de eventos en que se presenta) mediante mecanismos que involucran la síntesis del óxido nítrico a nivel endotelial, activando la sintasa del óxido nítrico (eNOS); este efecto no se observa en ratones Kiss^{-/-} debido a que no expresan el gen Kiss 1 (Hellier et al., 2018). Además, en la rata macho, la administración de kisspeptina en la MeA incrementó significativamente el número de erecciones debido a la activación del receptor GPR54, efecto que se bloquea y disminuye casi a niveles control con la administración del P234 (Gresham et al., 2016). Estos estudios puntuales demuestran que la kisspeptina actúa también a nivel central para modular la conducta sexual de manera muy directa.

1.3.5.3 Kisspeptina como mediador de conductas reforzantes

Existen diversos estudios donde ya se ha evaluado el papel de la kisspeptina en la conducta sexual humana. En un estudio utilizando la resonancia magnética funcional (fMRI) en el que se les presentó a hombres sanos diferentes tipos de estímulos visuales en el resonador (neutros, negativos, con contenido afectivo, y sexual) y se les administró kisspeptina por vía intravenosa, se reportó tanto un incremento en la conectividad de áreas relacionadas con el procesamiento del contenido sexual (amígdala, cíngulo, hipocampo) como un decremento general en la conectividad de áreas que regulan la aversión sexual (Comninos et al., 2017). También se ha descrito en un estudio en humanos, que la kisspeptina aumentó la actividad cerebral en diversas áreas del sistema límbico tras la exposición a estímulos visuales y olfativos contra los controles, mejorando la percepción de la atractividad (muy importante en el aspecto motivacional del sexo) aumentando así las probabilidades de que se lleve a cabo un acercamiento sexual (Yang, Comninos, & Dhillon, 2018).

Se ha propuesto que el papel que juega la kisspeptina como agente reforzante puede deberse a que se han encontrado receptores a opioides tipo kappa (κ) en neuronas KNDy, las cuales regulan los estados apetitivos mediados por opioides endógenos (Weems et al., 2016), pero aún no se comprenden todos los factores que están involucrados. Por otra parte se ha comprobado que la inyección de morfina o β -endorfinas disminuyen significativamente los niveles circulantes de la hormona luteinizante y de esteroides gonadales, mediante la unión a receptores tipo μ indicando el efecto de estos sobre el eje reproductivo (Mahmoudi, Khazali, & Janahmadi, 2014). Sin embargo, hace falta más investigación para entender la participación de la kisspeptina, así como su interacción con otras sustancias en dichos sistemas de recompensa.

2 JUSTIFICACIÓN

La kisspeptina está involucrada en diferentes aspectos de la reproducción mediante la liberación de la GnRH, que es crucial para el inicio de la pubertad y el mantenimiento de la vida fértil. Además, la presencia de su receptor en regiones que participan en el procesamiento de la recompensa y la motivación de conductas motivadas (NAcc, MeA, VTA) sugiere que el neuropéptido puede desempeñar un papel funcional en la mediación de las conductas apetitivas, incluyendo la conducta sexual. En el presente trabajo evaluamos si la kisspeptina participa en la receptividad sexual de la rata hembra así como en los estados afectivos positivos asociados a la conducta sexual.

3 HIPÓTESIS

La kisspeptina participa en la motivación sexual. Por una parte a través de la inducción de los estados afectivos positivos (cuantificado como un incremento en el tiempo de permanencia en el compartimento reforzado); y por otra, en la receptividad sexual de la rata hembra en la cópula regulada.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar si la kisspeptina participa en la activación de los estados afectivos positivos durante la cópula regulada y explorar su efecto sobre la conducta sexual en la rata hembra.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el efecto de la kisspeptina sobre la conducta sexual de la hembra cuando ésta regula la cópula.

- Evaluar el tiempo de permanencia en el compartimento reforzado mediante el paradigma del CPL con kisspeptina a diferentes dosis.
- Evaluar el efecto que produce el bloqueo de la kisspeptina tras la administración de diferentes dosis del antagonista (P234-penetratin) sobre la conducta sexual de la hembra cuando ésta regula la cópula.
- Evaluar si al antagonizar a la kisspeptina se bloquea el estado efectivo positivo evaluado por el CPL inducido por la cópula regulada.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

Para los experimentos realizados en este proyecto de investigación se utilizaron:

5.1 Animales

Se utilizaron ratas macho y hembra adultos de la cepa Wistar alimentadas *ad libitum* y mantenidas en un ciclo invertido de luz-obscuridad de 12 h. Las hembras, con un peso de entre 250 y 300 gramos, fueron ovariectomizadas bajo anestesia utilizando una cocktail de ketamina y xilacina al 70% y 30% respectivamente a razón de 1 mL de la mezcla por cada kg de peso de la rata. (40 mg/kg de ketamina y 6 mg/kg de xilacina). Posterior a la cirugía y en los días consecutivos se les aplicó una pomada de nitrofurazona (200 mg/100 g) en la herida. Se les permitió a las ratas un periodo de dos semanas de recuperación antes de proceder con las pruebas experimentales, durante el cual se les manipulaba a diario para habituarlas al manejo.

Para las pruebas de conducta sexual se utilizaron como animales estímulo a ratas macho de entre 350 y 400 gramos. Los machos fueron entrenados con hembras sexualmente receptivas y se seleccionaron a los que eyacularon al menos una vez en 30 minutos en cuatro sesiones de cópula, las hembras no tuvieron experiencia sexual previa a las pruebas conductuales.

5.2 Fármacos y hormonas

Para inducir la receptividad sexual se administraron por vía subcutánea 5 µg de E2 y 500 µg de P4 (*Sigma-Aldrich, USA*) Las hormonas fueron disueltas en aceite de maíz (vehículo) y se inyectaron por vía subcutánea (0.2 mL/rata) 48 h antes a la cópula en el caso del E2 y 4 h antes para la P4.

Para las pruebas conductuales asociadas a la cópula regulada se utilizó kisspeptina-10 (*Sigma-Aldrich, USA*) y el antagonista del receptor GPR54 de kisspeptina; P234 penetratin (*Phoenix pharmaceuticals, USA*). Para su administración se prepararon alícuotas en solución salina (vehículo) y se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p.). La kisspeptina se administró en dosis de 7 nmol (Navarro, Castellano et al. 2005) ó 14 nmol (Comninos, Anastasovska et al. 2016) según el experimento, una hora previa a las pruebas, y el antagonista (15 nmol) se repartió en 3 dosis de 5 nmol c/u administrándose una cada hora previo a las pruebas (Roseweir, 2009).

5.3 Condicionamiento de Preferencia de Lugar

Durante todo el proceso experimental, las ratas se manipularon a diario para habituarlas al manejo. El CPL se realizó en una caja como la que se observa en la figura 12. Consta de tres compartimentos con características diferentes. Un compartimento lateral es blanco con textura en el piso (se coloca una pieza de acrílico). El otro compartimento lateral es negro y liso, pero impregnado con ácido acético glacial al 2% en sus paredes, ambos compartimentos son de 27 x 37 x 32 cm. El compartimento central es de menor tamaño (22 x 24 x 32 cm), de color gris sin textura ni aroma e interconecta a los dos laterales. De este modo los tres compartimientos son diferentes en cuanto a estímulos de color, textura y aroma. Las cajas están interconectadas por puertas deslizables (10 x 15 cm) que se levantan cuando comienzan los registros, mismos que se realizan con luz roja.



Figura 12. Caja de condicionamiento de preferencia de lugar. Imagen de autoría propia.

El condicionamiento consistió en ocho sesiones, primeramente, las ratas se sometieron a una preprueba donde se evaluó su preferencia inicial. Para ello, se colocó al sujeto en el compartimento central (gris) durante 1 minuto y posteriormente se levantaron las compuertas de ambos lados para que la rata pueda acceder al compartimento blanco o negro. Se registró durante 10 minutos el tiempo que pasó en cada compartimento (el registro para cada compartimento cuenta a partir de que la rata atraviesa la línea divisoria con sus extremidades delanteras). En los siguientes días, las ratas se sometieron a tres sesiones de reforzamiento y no reforzamiento alternadas en días consecutivos. Para las sesiones de reforzamiento (R, compartimento no preferido) y no reforzamiento (NR; compartimento preferido) se colocó a la rata en el compartimento indicado por 30 minutos. El octavo día se realizó una prueba similar a la preprueba, durante la cual se dejó que la rata elija su compartimento preferido como se aprecia en la figura 13.

**SESIÓN
1**

SESIÓN

**SESIÓN
3, 5 Y 7**

**SESIÓN
8**

Figura 13. Diagrama del condicionamiento de preferencia de lugar.

5.4 Medición del reflejo de lordosis.

Durante el despliegue de la conducta sexual la lordosis es un indicativo del grado de receptividad de la hembra (Zipse, Brandling-Bennett, & Clark, 2000) se reporta el grado de ésta por el nivel de dorsiflexión que presenta la hembra durante la cópula, con los valores de 0 (nula), 1 (elevación leve) y 2 (dorsiflexión completa) como se observa en la Figura 14 (Hardy & DeBold, 1971).

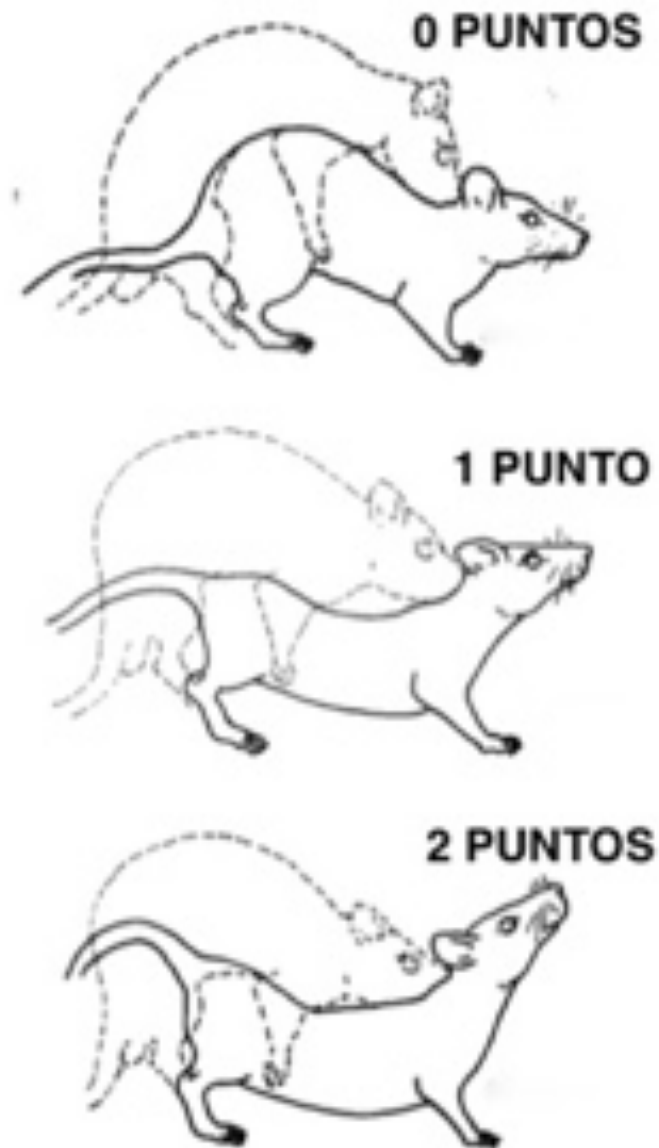


Figura 14. Puntaje para la intensidad de lordosis. Modificado de (Hardy & DeBold, 1971).

La intensidad de lordosis se cuantifica como el cociente de la sumatoria de puntos de lordosis entre el número total de eventos de lordosis que presentó la hembra:

$$\text{Intensidad Media de Lordosis} = \frac{\Sigma \text{Puntos de Lordosis}}{\Sigma \text{Lordosis}}$$

En tanto que el coeficiente de lordosis se obtiene mediante el número total de eventos de lordosis entre el número total de eventos recibidos por la hembra (montas, intromisiones y eyaculaciones) multiplicado por 100:

$$\text{Coeficiente de Lordosis} = \frac{\Sigma \text{Lordosis}}{\Sigma \text{Montas, Intromisiones y Eyaculaciones}} \times 100$$

5.5 Grupos y tratamientos

5.5.1 Experimento 1: Determinación de las dosis de progesterona y E2

Las dosis subcutáneas utilizadas y estandarizadas en nuestro laboratorio son de 1 mg de P4 y 25 µg de E2 para inducir altos niveles de receptividad sexual (Paredes & Alonso, 1997). Dado que las neuronas kisspeptinérgicas expresan receptores a E2 y P4, éstas hormonas pueden modular la expresión de kisspeptina (Mittelman-Smith, Wong, & Micevych, 2018). Al inducir altos niveles de receptividad con nuestro tratamiento convencional, pudiéramos no observar una facilitación de conducta sexual por la kisspeptina. En consecuencia probamos dosis menores de estradiol y progesterona para inducir una menor intensidad media de lordosis y observar los efectos de kisspeptina. Por lo tanto, se realizó un experimento con ocho ratas hembra en sesiones de cópula libre con dosis reducidas (500 µg de P4 y de E2 2.5 y 5 µg) (Beach, 1942). Posteriormente se evaluaron la intensidad media y el coeficiente de lordosis.

5.5.2 Experimento 2: Efecto de la kisspeptina sobre la cópula regulada en hembras

Se probó el efecto de la kisspeptina (14 nmol) en la cópula regulada (30 min). Se realizó un cuadro latino en el que a cada rata se le aplicaron tres tratamientos en diferentes sesiones. Los tratamientos tras la administración previa con E2 fueron P4, Kp, P4 + Kp, como se aprecia en la tabla 1. La dosis de kisspeptina (14 nmol) (Comninou, Anastasovska et al. 2016) se administró por vía intraperitoneal (i.p.) y todo el proceso del experimento se esquematiza en la figura 15, se evaluaron la intensidad y el coeficiente de lordosis, el porcentaje de salidas, y el tiempo de latencia. Adicionalmente se cuantificó el número de eventos copulatorios totales. Se utilizaron 9 ratas ovariectomizadas y tratadas todas con E2, y cada 5 días se les alternó el tratamiento de acuerdo al diseño del cuadro latino.

Hora de la inyección (horas antes de la cópula)	Grupos (n=9 por grupo)			
	Control	E2 + Kp	E2 + P4 + Kp	E2
48	E2 (2.5 µg)	E2 (2.5 µg)	E2 (2.5 µg)	E2 (2.5 µg)
4	P4 (500 µg)		P4 (500 µg)	
1		Kp (14 nmol)	Kp (14 nmol)	

Tabla 1. Grupos y tratamientos del Experimento 2.

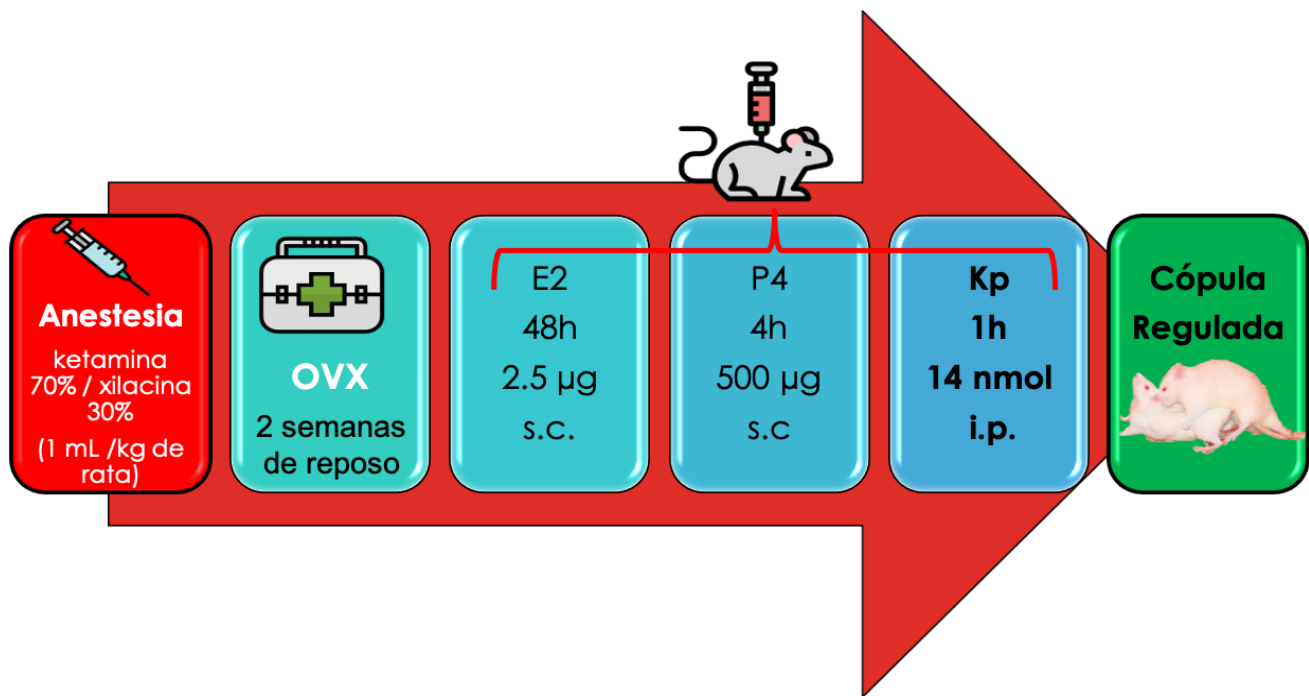


Figura 15. Administración de fármacos durante el Experimento 2.

5.5.3 Experimento 3: Efecto del antagonista a kisspeptina sobre la cópula regulada en hembras

Se evaluó la conducta sexual en sesiones de “pacing” de 30 min donde se realizó un cuadro latino en el que cada rata pasó por cuatro tratamientos en sesiones diferentes. Los tratamientos tras la administración previa de E2 (hay un grupo de solo E2) fueron: P4 (Control), P234 (7.5nmol) + Kp (14 nmol) y P234 (15nmol) + Kp (14 nmol) como se aprecia en la tabla 2. Se evaluaron dos dosis del antagonista, una dosis baja (7.5 nmol) y otra dosis alta (15 nmol) (Pineda, 2010; Roseweir, 2009) que son las dosis reportadas con el mejor efecto sobre el modelo experimental. Estas dosis del antagonista se difirieron en 3 administraciones espaciadas cada hora, tres horas antes de la conducta sexual y en la última se coadministró con la dosis de kisspeptina (14 nmol), dicho proceso de dosificación se esquematiza en la figura 16. Posteriormente se evaluaron la intensidad y el coeficiente de lordosis, el porcentaje de salidas, y el tiempo de latencia (tiempo que tarda la hembra en regresar al compartimento del macho). Se utilizaron ocho ratas ovariectomizadas, cada 5 días se les alternó el tratamiento de acuerdo al diseño del cuadro latino.

Hora de la inyección (horas antes de la cópula)	Grupos (n=8 por grupo)			
	Control	P234 (7.5nmol) + Kp (14 nmol)	P234 (15nmol) + Kp (14 nmol)	E2
48	E2 (2.5 µg)	E2 (2.5 µg)	E2 (2.5 µg)	E2 (2.5 µg)
4	P4 (500 µg)	P4 (500 µg)	P4 (500 µg)	
3		P234	P234	
2		P234	P234	
1		P234 + Kp	P234 + Kp	

Tabla 2. Grupos y tratamientos del experimento 3.

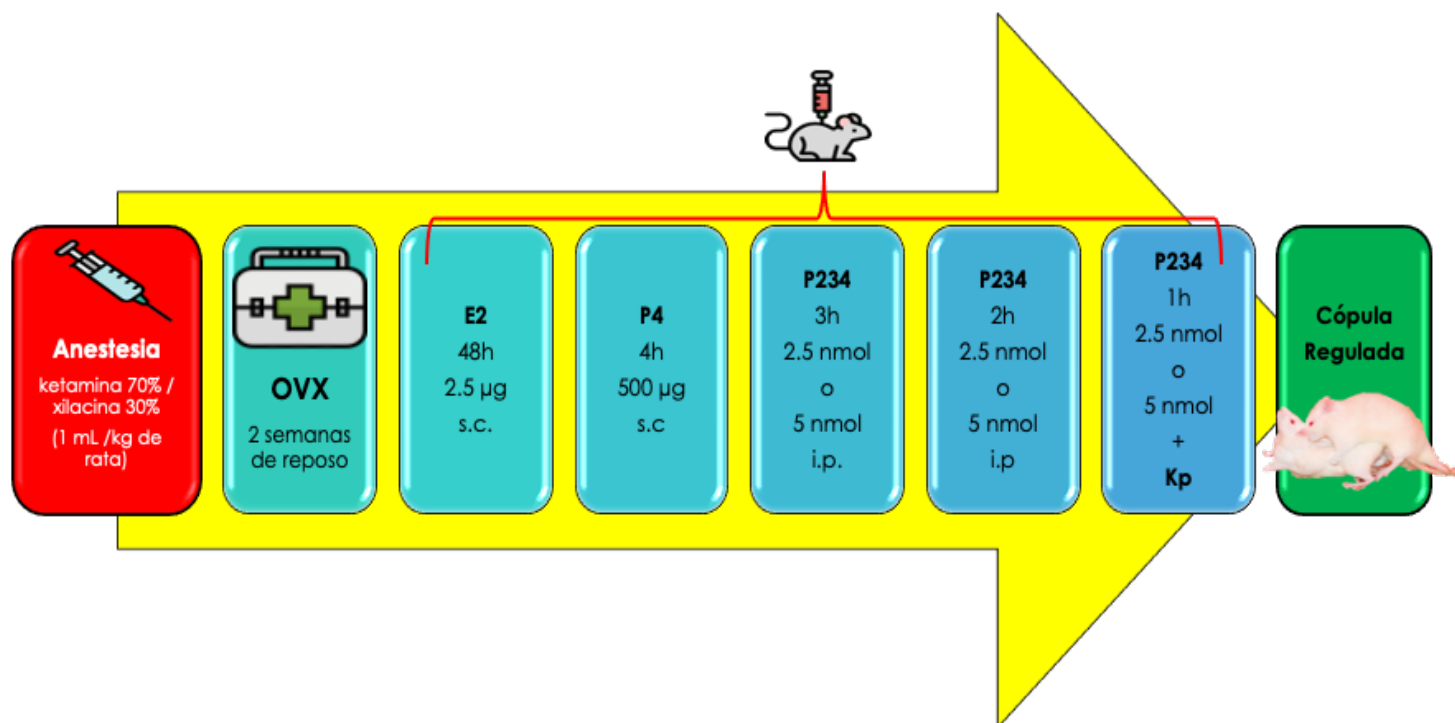


Figura 16. Administración de fármacos durante el Experimento 3.

5.5.4 Experimento 4: Condicionamiento de preferencia de lugar con kisspeptina

Las ratas hembra se sometieron al CPL tratadas con las dosis de E2 y P4 validadas en el Experimento 1. El CPL se realizó de acuerdo con el apartado 5.3 y la figura 13. Se inyectó kisspeptina i.p. a 7 o 14 nmol/rata o solución salina 30 minutos antes de la prueba, se utilizaron 11 ratas por tratamiento.

5.5.5 Experimento 5: Condicionamiento de preferencia de lugar con P234

Se realizó el CPL en hembras tratadas con las dosis de E2 y P4 validadas en el experimento 1. El CPL se realizó de acuerdo con el apartado 5.3 y la figura 13, para los siguientes grupos: Cópula Regulada (CR -30 min-), Copula Regulada + P234 (CR + P234) y Control (Sin CR). Las inyecciones de antagonista (15 nmol) se realizaron de manera diferida de acuerdo con la figura 16, se utilizaron ocho ratas por grupo.

5.6 Análisis estadístico

Para evaluar si los datos se ajustaban a una distribución normal, se realizaron las pruebas de Kolmonorov-Smirnof y Shapiro Wilk. Dado que los resultados del pacing no fueron normales, se utilizó el equivalente a ANOVA no paramétrico (Kruskall Wallis) para ver si había diferencia entre grupos. Finalmente, si el valor P para Kruskall Wallis resultó menor o igual a ($p < 0.05$) se realizó la prueba posthoc para encontrar diferencias entre pares de grupos.

Para los resultados de CPL se evaluó la normalidad de los datos, siendo ésta positiva, se utilizó la prueba de t de Student pareada para encontrar diferencias significativas entre pre-prueba y prueba final de cada grupo, para los casos donde no pasó la prueba de normalidad, se realizó el equivalente a la t de Student no paramétrica (Wilcoxon), considerándose significativa con un valor menor o igual a ($p < 0.05$)

6 RESULTADOS

6.1 Experimento 1: Evaluación de dosis inferiores de E2 y P4.

Las hembras que recibieron las dosis más bajas de E2 (2.5 y 5 μg) y P4 (500 μg) presentaron una intensidad media y un coeficiente de lordosis similares entre sí ($p>0.05$) pero superiores a las hembras del grupo control que no recibieron tratamiento hormonal ($p=0.0001$), como se aprecia en la figura 17.

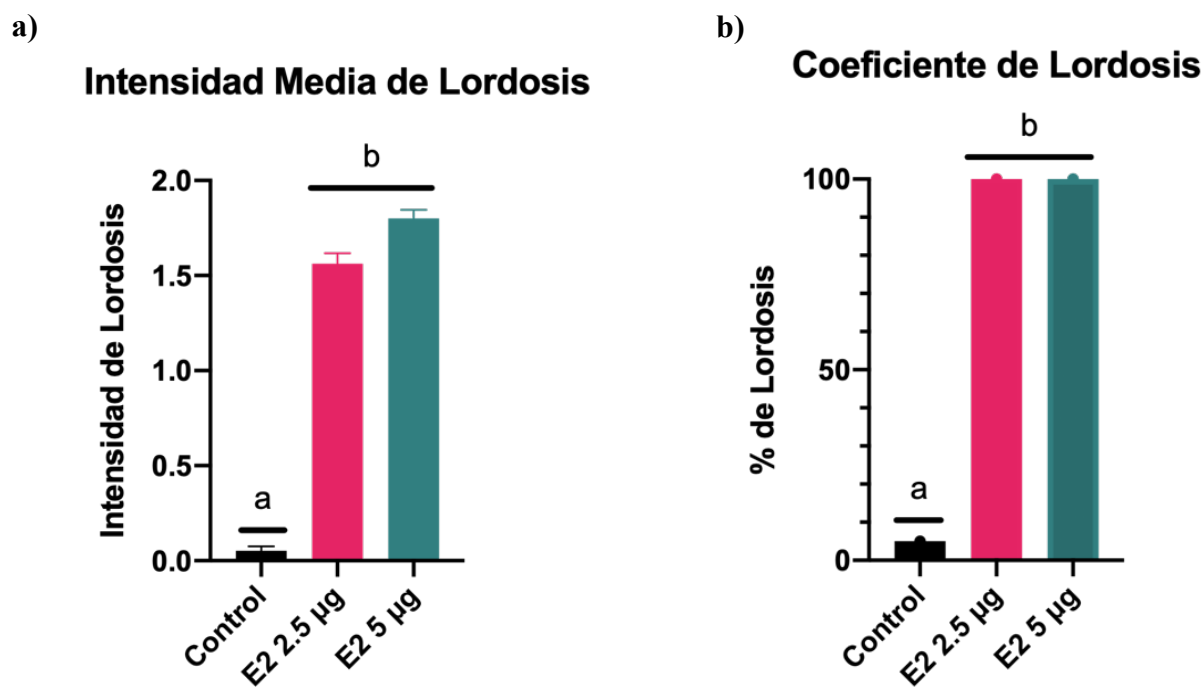


Figura 17. Evaluación de dosis bajas de E2 y P4 en **a)** Intensidad media de lordosis y **b)** Coeficiente de lordosis. El grupo control recibió dos inyecciones de vehículo. Los otros 2 grupos recibieron las dosis correspondientes de E2 más una dosis de P4 de 500 μg . Los datos se representan como media \pm error estándar ($n=8$ en cada grupo). Las letras diferentes indican diferencias significativas de al menos $p<0.05$.

6.2 Experimento 2. Efecto de la kisspeptina sobre la cópula regulada por las hembras

Se evaluó el efecto que tiene la administración de la kisspeptina sobre la cópula regulada. Se agruparon todos los eventos por grupo (montas, intromisiones y eyaculaciones). Para las pruebas de latencia de regreso se realizó una prueba de Kruskal Wallis ($p < 0.0001$), en el grupo que recibió únicamente E2, se observó una menor latencia de regreso comparado con los grupos E2 + P4 ($p = 0.0002$), E2 + Kp ($p = 0.0030$) y E2 + P4 + Kp ($p = 0.0049$). No hubo diferencia significativa entre los grupos E2 + P4, E2 + Kp ni E2 + P4 + Kp en ambas variables como se aprecia en la figura 18. Para las pruebas de porcentaje de salida, no hubo diferencia significativa en la prueba de Kruskal Wallis ($p = 0.0572$).

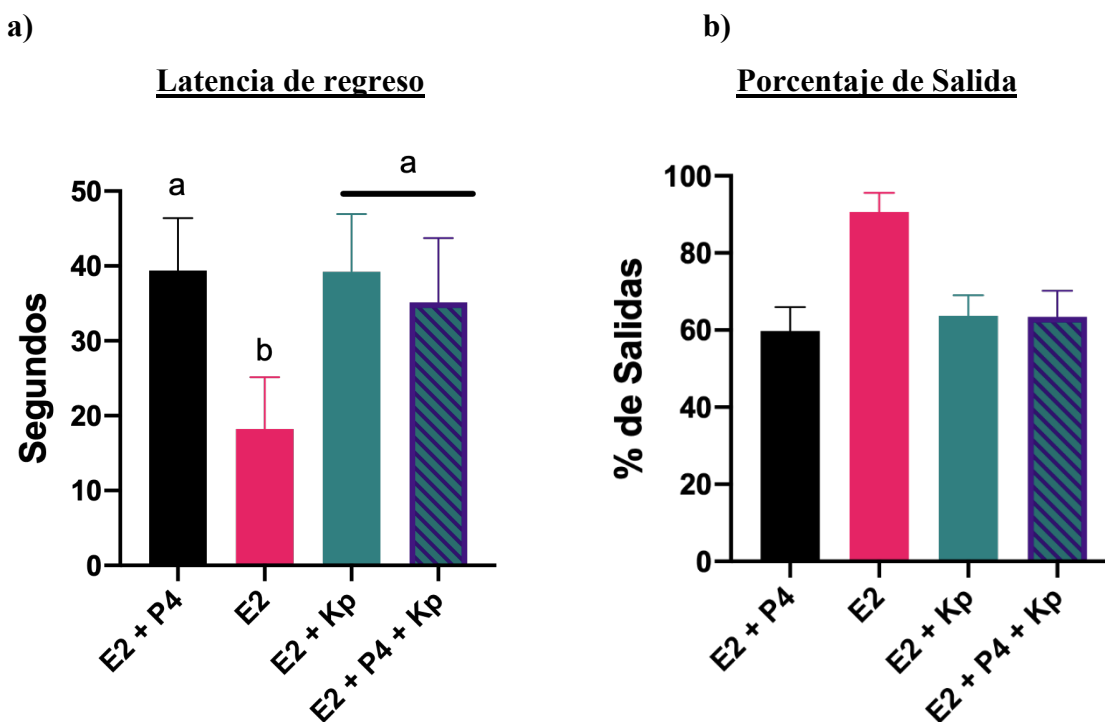


Figura 18. Resultados para la evaluación del efecto de kisspeptina sobre la conducta sexual en la rata hembra en **a)** Latencia de regreso y **b)** Porcentaje de veces que la hembra salió del compartimento del macho. La dosis de E2 fue de 2.5 μg , de P4 de 500 μg y de Kp de 14 nmol. Los datos se representan como media \pm error estándar ($n=9$). Las letras indican diferencias significativas de al menos ($p < 0.05$).

También se evaluó el coeficiente y la intensidad de lordosis. No se encontraron diferencias significativas entre grupos en el coeficiente de lordosis. Para la intensidad de lordosis se realizó una prueba de Kruskal Wallis ($p < 0.0054$), encontrando diferencias entre el grupo de ratas administradas solo con E2 respecto a los grupos E2 + P4 ($p = 0.0163$), E2 + Kp ($p = 0.0047$) y E2 + P4 + Kp ($p = 0.0093$) como se aprecia en la figura 19.

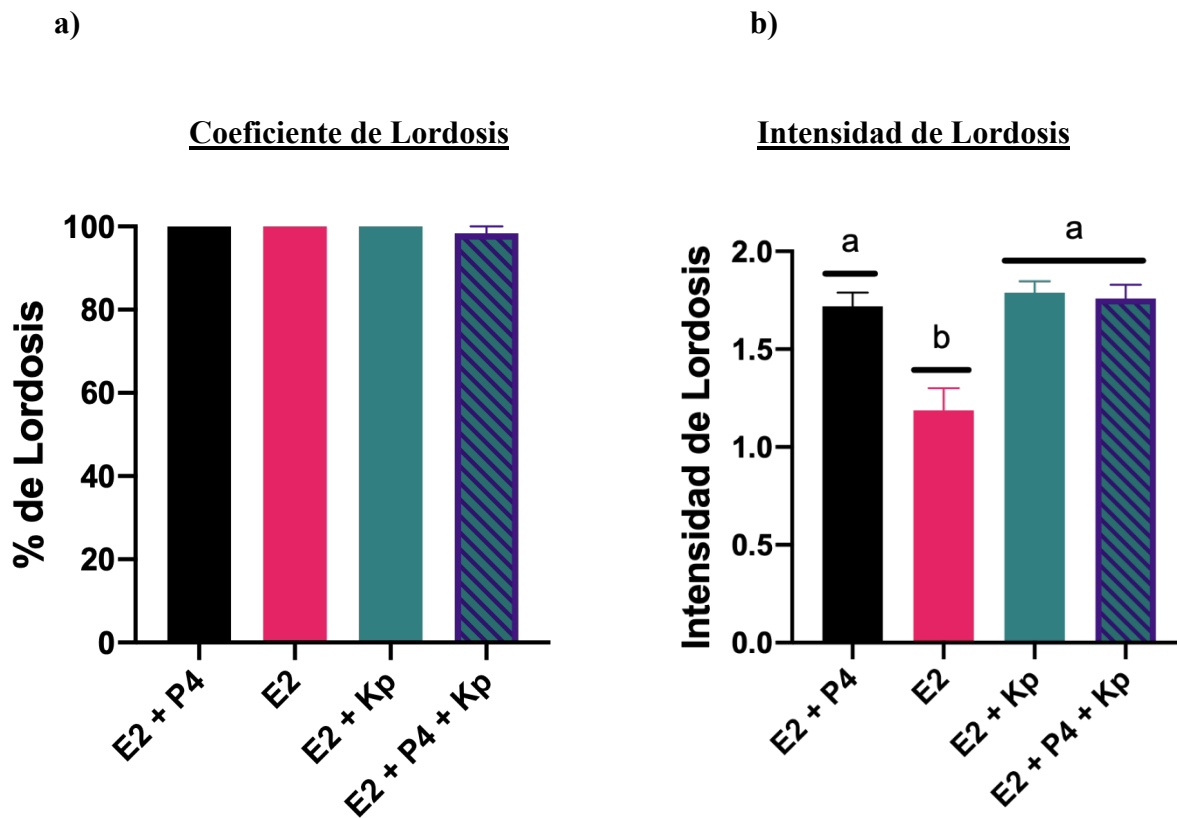


Figura 19. Resultados para la evaluación del efecto de kisspeptina sobre la conducta sexual en la rata hembra en **a)** Coeficiente de Lordosis. **b)** Puntaje medio de intensidad de lordosis para el total de eventos. La dosis de E2 fue de 2.5 μg , de P4 de 500 μg y de Kp de 14 nmol. Los datos se representan como media \pm error estándar ($n=9$). Las letras indican diferencias significativas de al menos ($p < 0.05$).

6.2.1 Experimento 2. Conducta sexual de los machos

El estado receptivo de la hembra influye directamente en el comportamiento del macho debido a señales olfativas que afectan la conducta sexual por lo que se evaluó como se modifica su comportamiento sexual en presencia de hembras que fueron tratadas con E2 y P4. Como se aprecia en la figura 20 los machos que tuvieron contacto con hembras que solo fueron administradas con E2 presentaron menos eventos que los demás grupos. Los valores por evento (monta, intromisión y eyaculación) y grupo son: E2 (35, 19 y 4), E2 + P4 (152, 196 y 12), E2 + Kp (91, 214 y 19) y finalmente E2 + P4 + Kp (143, 161, y 12).

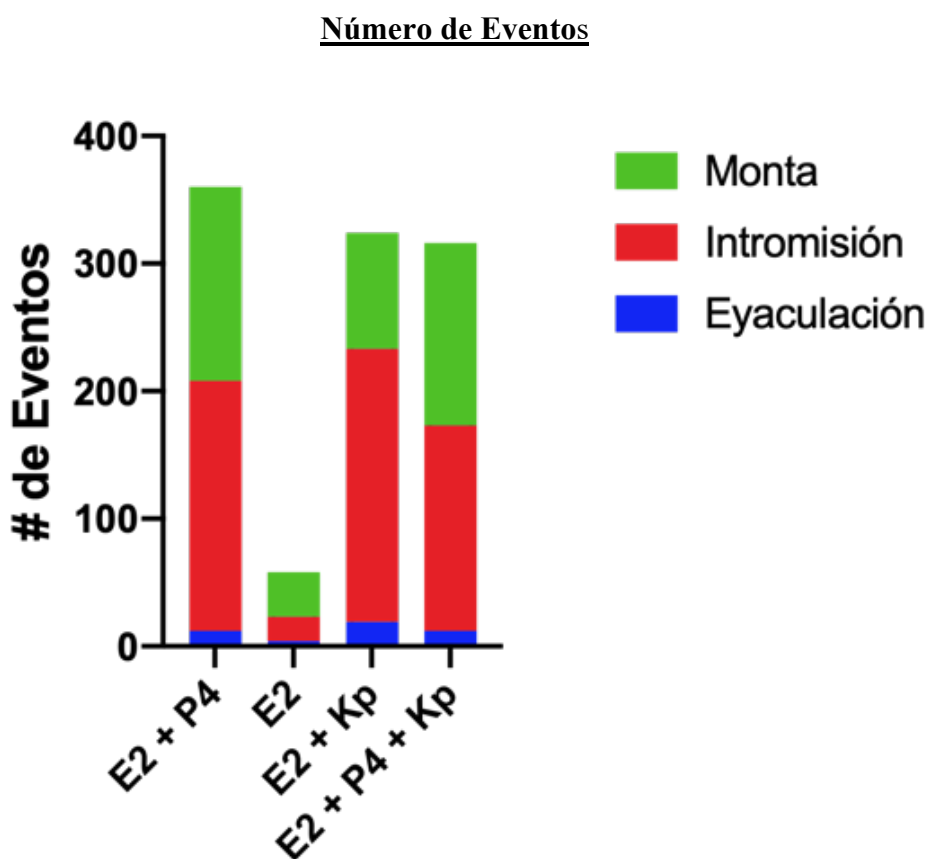


Figura 20. Número de eventos con la aplicación de kisspeptina. La dosis de E2 fue de 2.5 μg , de P4 de 500 μg y de Kp de 14 nmol (n=9). No se calcularon medias, dado que son datos totales.

6.3 Experimento 3. Efecto del antagonista P234 sobre la cópula regulada por hembras.

De la misma manera que en el experimento 2, se evaluó el efecto que tiene la administración del antagonista (P234) sobre la cópula regulada en ratas pretratadas con E2 y kisspeptina. Para analizar la prueba de latencia de regreso, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.0003$). Aunque no hubo diferencia significativa entre los grupos E2 + P4, E2 + Kp + P234 7.5 nmol ni E2 + Kp + P234 15 nmol, si se encontraron diferencias entre los grupos E2 + P4 vs. E2 ($p = 0.0031$), E2 + P4 vs. E2 + Kp + P234 nmol (7.5 nmol) ($p = 0.0016$) y E2 + P4 vs. E2 + P4 + Kp + P234 (15 nmol) ($p = 0.0119$). Para el análisis del porcentaje de salida no se encontró diferencia significativa en ningún grupo ($p = 0.4775$), como se aprecia en la figura 21.

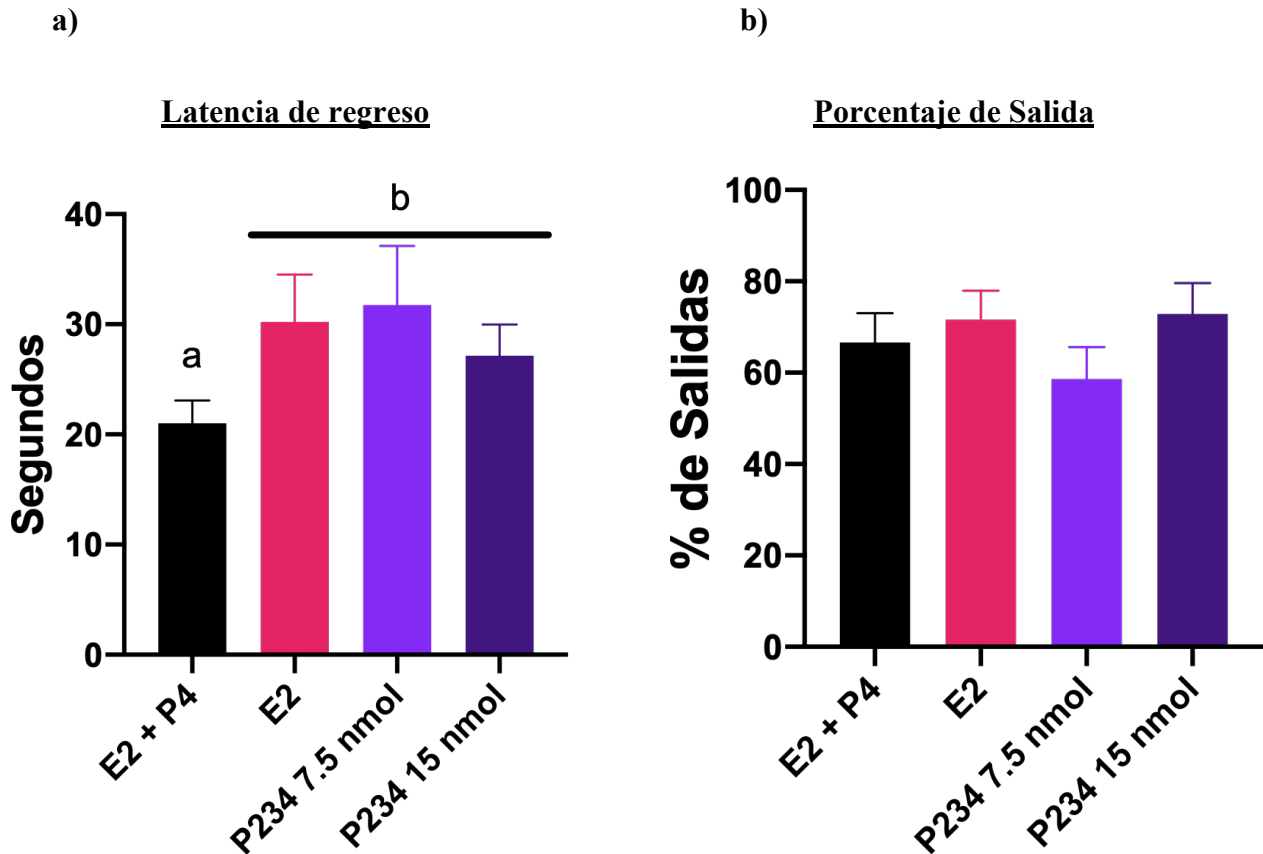


Figura 21. Resultados para la evaluación del bloqueo de kisspeptina (P234) sobre la conducta sexual de la hembra en a) Latencia de regreso. b) Porcentaje de veces que la hembra salió del compartimento del macho. Los grupos recibieron las dosis de E2 de 2.5 μg , de P4 de 500 μg , Kp de 14 nmol y de antagonista P234 de 7.5 o 15 nmol. Los datos se representan como media \pm error estándar ($n=8$). Las letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

También se evaluaron el coeficiente y la intensidad de lordosis. En los resultados del coeficiente de lordosis no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) resultando este similar entre los grupos. Para la evaluación de la intensidad de lordosis se realizó la prueba de Kruskal Wallis ($p < 0.0001$) donde se encontraron diferencias entre los grupos E2 vs. P234 7.5 nmol ($p = 0.0001$) E2 + P4 vs. P234 15 nmol ($p = 0.0005$), y E2 + P4 vs. E2, E2 + P4 vs. P234 7.5 nmol y E2 vs. P234 15 nmol todos con ($p = 0.0001$) resultando significativos. Por lo que las dos dosis de antagonista bloquearon parcialmente el efecto de la Kp ya que las hembras que recibieron este tratamiento, presentaron una intensidad media de lordosis más alta que el grupo que solo recibió E2 pero significativamente más baja que el grupo control. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos de antagonista entre sí como se puede apreciar en la figura 22.

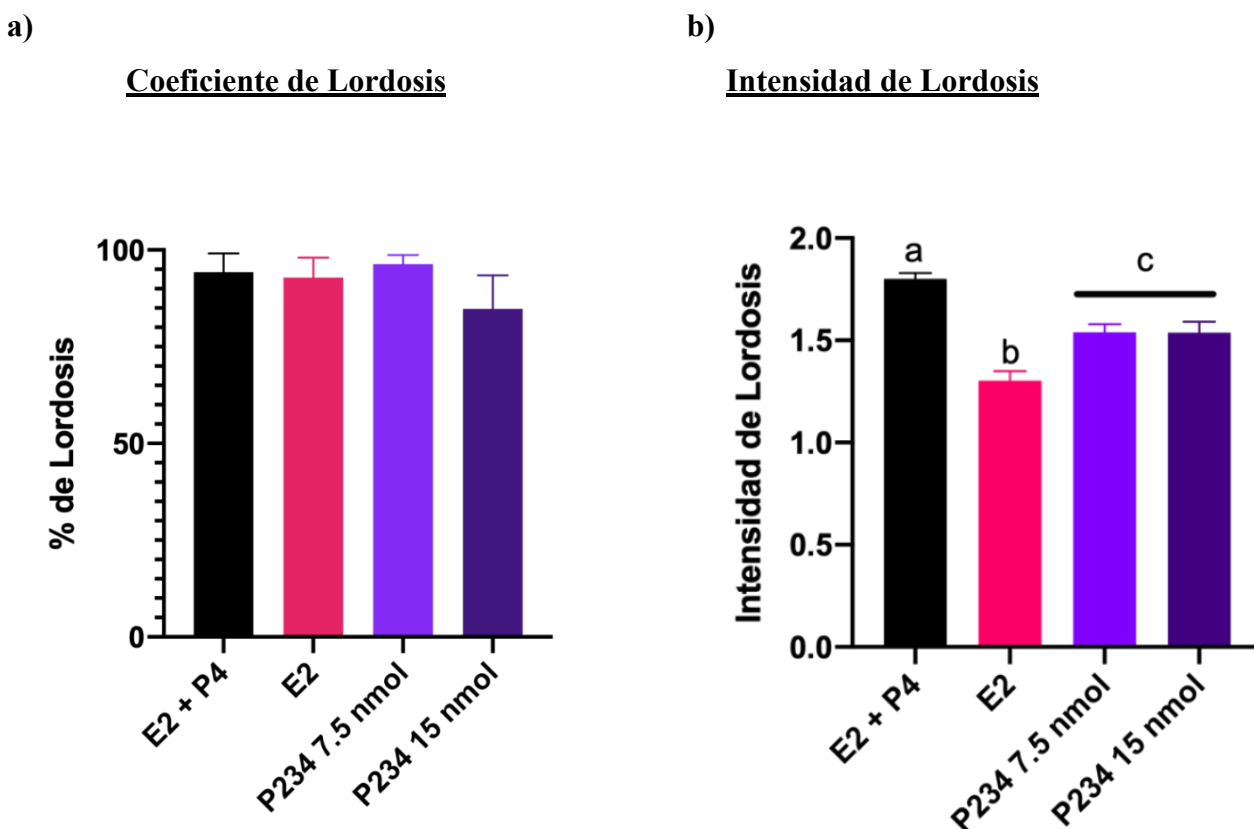


Figura 22. Resultados para la evaluación del bloqueo de kisspeptina (P234) sobre la conducta sexual de la hembra en **a)** Coeficiente de Lordosis. **b)** Puntaje medio de intensidad de lordosis para el total de eventos. Los grupos recibieron las dosis de E2 de 2.5 μ g, de P4 de 500 μ g, Kp de 14 nmol y de antagonista P234 de 7.5 o 15 nmol. Los datos se representan como media \pm error estándar ($n=8$). Las letras indican diferencias significativas de al menos ($p < 0.05$).

6.3.1 Experimento 3. Conducta sexual de los machos

De la misma manera que el experimento de conducta sexual con kisspeptina; se evaluó el número de eventos de los machos cuando copularon con hembras que recibieron los tratamientos del Experimento 4. No se encontraron diferencias significativas en el número de eventos de los diferentes grupos como se aprecia en la figura 23.

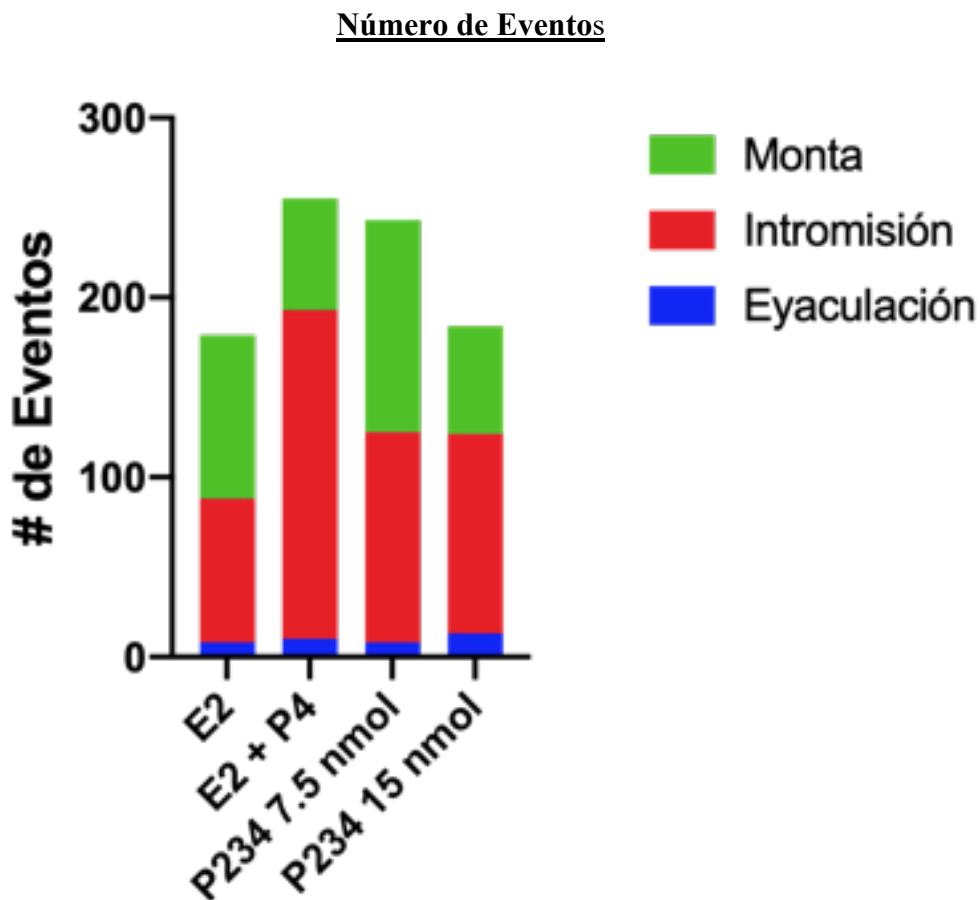


Figura 23. Número de eventos con la aplicación de kisspeptina y su antagonista (P234). Los grupos recibieron las dosis de E2 de 2.5 μg , de P4 de 500 μg , Kp de 14 nmol y de antagonista P234 de 7.5 o 15 nmol ($n=8$). No se calcularon medias, dado que son datos totales.

6.4 Experimento 4. Condicionamiento de preferencia de lugar con kisspeptina

No se encontró diferencia significativa en el tiempo pasado en el compartimento reforzado entre la preprueba y prueba del grupo control ($t_{(10)}= 2.186$, $p=0.537$). En cambio se encontró un incremento significativo en las hembras que fueron inyectadas con 7 nmol ($t_{(10)}= 4.718$, $p=0.0008$) o 14 nmol ($t_{(10)}= 3.677$, $p=0.0043$) de kisspeptina como se observa en la figura. 24, es decir, es reforzante.

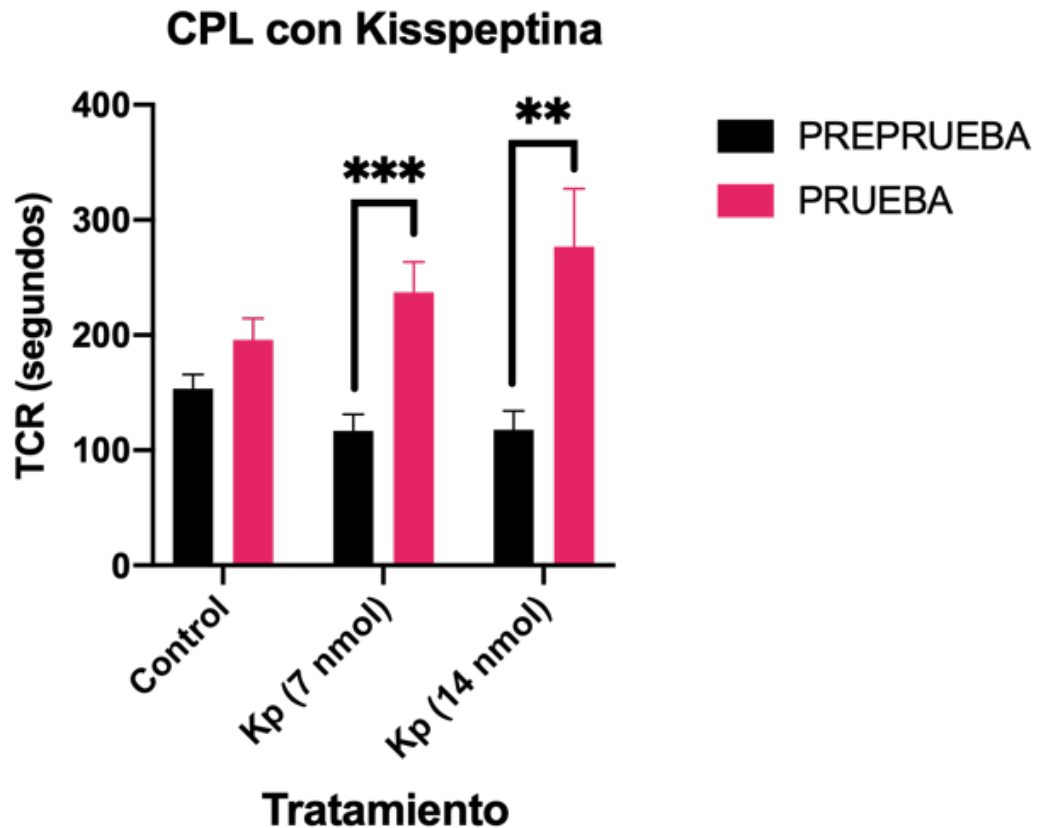


Figura 24. Resultados del tiempo en el compartimento reforzado (TCR) en la pre-prueba y prueba de los diferentes grupos de hembras que recibieron inyecciones i.p. de solución salina (control), kisspeptina 7 nmol o 14 nmol. Los datos se representan como media \pm error estándar (n=11).

6.5 Experimento 5. Condicionamiento de preferencia de lugar con P234

En la prueba de CPL no se encontró diferencia significativa entre el tiempo pasado en el compartimento reforzado para el grupo Control ($t_{(7)} = 0.2543$, $p = 0.9609$), ni para el grupo de CR + P234 ($t_{(11)} = 1.861$, $p = 0.1099$), sin embargo, para el grupo CR ($t_{(11)} = 2.490$, $p = 0.0342$) se encontró una diferencia significativa entre la preprueba y la prueba, como se aprecia en la figura 25.

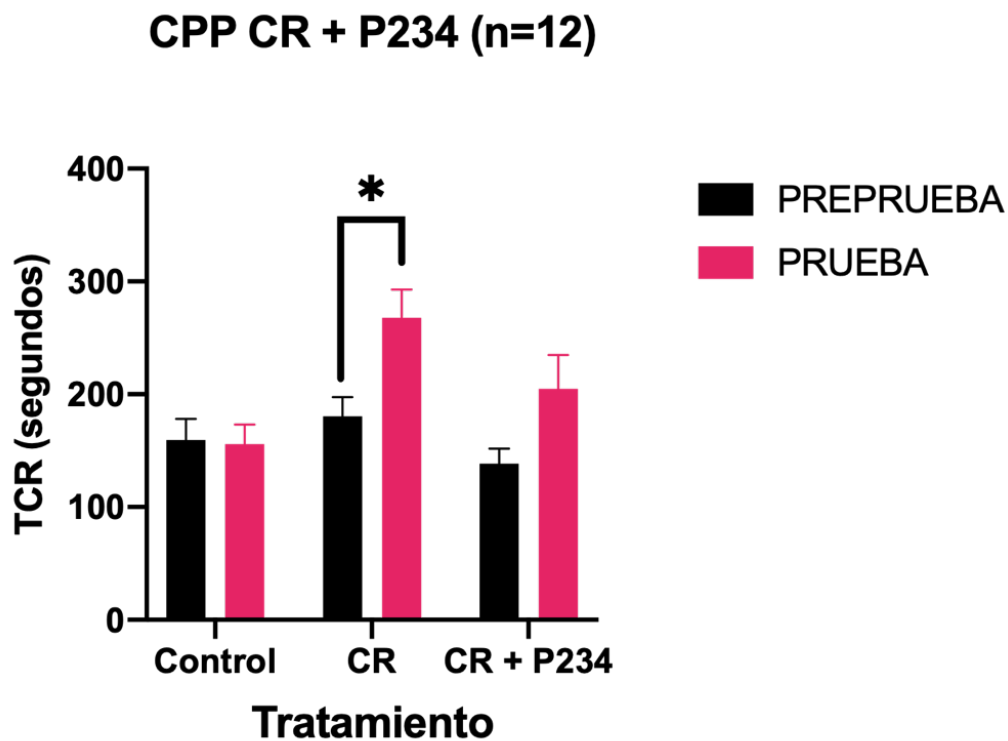


Figura 25. Resultados del tiempo en el compartimento reforzado (TCR) en la pre-prueba y prueba de los diferentes grupos de hembras en sesiones de cópula regulada (CR) de 30 min que recibieron inyecciones i.p. de P234 de 15 nmol o solución salina Control). Los grupos de CR, recibieron 25 μ g de E2 y 500 μ g de P4 para la inducción de la cópula, según lo descrito. Los datos se representan como media \pm error estándar ($n = 12$).

7 DISCUSIÓN

Durante el presente trabajo de investigación se realizaron diferentes experimentos, los cuales fueron: 1. Explorar la posibilidad de utilizar dosis menores de hormonas (E2 y P4) a las utilizadas habitualmente en el campo para inducir la conducta sexual en las ratas hembra, 2. Determinar el efecto que tiene la kisspeptina sobre la cópula regulada, 3. Evaluar cómo se ve modificada la conducta sexual con la administración de P234 (a grupos previamente tratados con E2 y kisspeptina), 4. Comprobar si la administración sistémica de la kisspeptina es reforzante mediante el paradigma del CPL, y finalmente, 5. Determinar si el P234 bloquea el estado afectivo positivo inducido por la cópula regulada.

En el presente trabajo comprobamos que las dosis de hormonas que administramos de E2 2.5 y 5 μg junto a los 500 μg de P4, son suficientes para inducir un estado de proceptividad y receptividad que permita observar una facilitación de la conducta femenina, ya que está ampliamente documentado que las concentraciones plasmáticas de E2 y P4 de la rata hembra varían a lo largo de su ciclo estral (Smith, 1975) y que éstas son fundamentales para el correcto despliegue de la conducta sexual (Beach, 1942). En ratas hembra de la cepa Wistar, las concentraciones plasmáticas de E2 y P4 son del orden de decenas de picogramos ($\times 10^{-12}$ g) hasta decenas de nanogramos ($\times 10^{-9}$ g) por mililitro, respectivamente (Faccio et al., 2013; Södersten & Hansen, 1979). Es evidente que las concentraciones administradas de manera exógena deben (y son) mayores a las concentraciones detectadas de manera endógena, ya que debido a fenómenos farmacocinéticos hay pérdidas significativas antes de alcanzar el estado estacionario de las hormonas en el plasma.

Nuestros resultados van de acuerdo con algunos protocolos clásicos de investigación para inducir la conducta sexual en hembras ovariectomizadas, donde se ha reportado que la administración subcutánea de dosis de 500 a 1000 μg de P4 y de 1 hasta 25 μg de E2 inducen niveles adecuados de coeficiente e intensidad de lordosis, lo cual favorece las conductas de receptividad y atraktividad (Beach, 1942; Paredes & Alonso, 1997; Whalen, 1974).

Además se ha descrito que el E2 ovárico regula la actividad de las neuronas de GnRH (Shaw et al., 2010) mediante un sistema de retroalimentación hacia los núcleos hipotalámicos, e indirectamente de las gonadotropinas como la hormona luteinizante (Karsch, 1987), siendo este mecanismo mediado por la kisspeptina (Dhillon et al., 2005; Navarro et al., 2005). Por lo que es de esperarse que el E2 administrado de manera exógena impacte directamente sobre la acción de la kisspeptina en dichos núcleos (AVPV y ARC) ya que ésta es la principal activadora de las neuronas de GnRH (Li et al., 2009).

Además, la administración de P4 inhibe la retroalimentación positiva que el E2 ejerce sobre el AVPV, suprime el pico preovulatorio de la GnRH (He et al., 2017) y el patrón pulsátil de la LH (Le, Attardi, Berghorn, Blaustein, & Hoffman, 1997). Ya que las neuronas GnRH no tienen receptores a E2 o a P4, es mediante las neuronas de kisspeptina que estas hormonas logran mediar sus efectos hipotalámicos, pues éstas sí presentan ambos tipos de receptores (Delhousay, Chuon, Mittleman-Smith, Micevych, & Sinchak, 2019), inclusive muchos estudios de los efectos de la kisspeptina se han descrito con base a su efecto sobre la GnRH. Es tan importante la expresión de receptores a progesterona (PGR) en las células de kisspeptina, que incluso la ausencia de éstos llega a suprimir completamente la función reproductiva (Gal et al., 2016; Roa et al., 2008).

Aunque un trabajo reciente en humanos demostró que no existe una relación directa entre los niveles plasmáticos de la kisspeptina y de las hormonas sexuales y que posiblemente ésta sólo sirva como disparador del ciclo menstrual (Katagiri, Kotani, Hirai, & Kagawa, 2015), en un modelo *in vitro* aún más reciente de células kisspeptinérgicas del RP3V se reportó que la señalización de P4 y de E2 incrementan los niveles de transcripción y liberación de la kisspeptina (Mittleman-Smith et al., 2018).

Con el objetivo de alcanzar un nivel de receptividad medio para poder ver cambios en el sentido positivo con la administración de hormonas, se disminuyeron las dosis de estradiol y progesterona.

Y para determinar como debían de ser estas dosis fue importante el análisis de estudios farmacocinéticos para que de esta manera el efecto de la kisspeptina sobre la conducta sexual fuera

lo más cercano a lo fisiológico, donde las concentraciones hormonales se deben únicamente a liberación endógena y no por la administración exógena. Un estudio que nos aportó idea de las concentraciones alcanzadas por la administración de hormonas de manera exógena demostró que con concentraciones de E2 (de 0.4 a 8 µg) y de P4 (20 a 220 mg) administrados a través de implantes subcutáneos (Silastic) a ratas ovariectomizadas se observó un aumento significativo de estas hormonas en los primeros días, pero luego se presentó una liberación lineal a los 7 a 24 días post implante, manteniéndose en promedio concentraciones séricas de E2 de 100 a 125 pg/mL, y de 7.5 a 10 ng/mL de P4 (Mannino, South, Inturrisi, & Quinones-Jenab, 2005) siendo estas concentraciones cercanas a las fisiológicas (Nilsson et al., 2015). Aunque no se midieron los niveles plasmáticos de E2 y P4 en este protocolo de investigación, al disminuir las dosis se garantiza un medio más propicio para el estudio aislado del efecto de la kisspeptina y su antagonista.

Por otra parte, los resultados obtenidos de las pruebas de cópula regulada tras la administración de estradiol y kisspeptina indican que con la administración de kisspeptina se inducen niveles similares de receptividad sexual a los alcanzados con el tratamiento clásico (E2 + P4). Sin embargo, en el grupo inyectado con estradiol, kisspeptina y progesterona, no se observaron niveles de receptividad mayores al grupo control, indicando que no existe un efecto sinérgico con la administración de ambas hormonas.

Una posible explicación a nuestros resultados es que la activación de las neuronas de kisspeptina requiere a su vez de la activación de sus receptores a estrógenos, mismos que son activados durante la fase de priming, ya que sin la actividad de E2, no hay receptividad sexual.

La amígdala es un importante relevo neuronal tras la captación de señales olfativas como los olores de un macho sexualmente activo que se consideran altamente apetecibles para las hembras dentro de la etapa motivacional de la cópula (Mayila et al., 2020; Sanathara, Moreas, Mahavongtrakul, & Sinchak, 2014), en la cual también se requiere el efecto de la progesterona para la activación de neuronas en el hipotálamo ventromedial, que a su vez permite el despliegue completo del reflejo de lordosis (García-Juárez et al., 2020; Micevych, 2013). Adicionalmente en la MeA se ha descrito

una importante población de neuronas kisspeptinérgicas que también están involucrada en el procesamiento de información sexual (Adekunbi et al., 2018; Pineda et al., 2017; Stephens, 2017).

Se ha reportado que la kisspeptina incrementa el coeficiente de lordosis en ratones pretratados con E2 (Hellier et al., 2018) lo que concuerda con nuestros resultados indicando que aún en ausencia de P4 se logra inducir niveles altos de lordosis. Una explicación a este efecto es que la kisspeptina podría estar actuando a varios niveles para inducir receptividad sexual, aunque no la induce directamente, si no que podría estar participando en la regulación de la receptividad sexual. En ratones, se ha demostrado que el efecto de la kisspeptina sobre la lordosis está mediado por la población de neuronas en el RP3V en el AVPV, las cuales actúan sobre neuronas que liberan al neurotransmisor óxido nítrico, que es importante durante el despliegue del reflejo de lordosis (Hellier et al., 2018). De hecho, se ha reportado que el óxido nítrico actúa a nivel de la sinapsis de neuronas de kisspeptina con la GnRH regulando su interacción (Constantin, Reynolds, Oh, Pizano, & Wray, 2021). De manera adicional, la población de neuronas de kisspeptina en la amígdala es muy importante para el procesamiento de señales feromonales de los machos que potencialmente pueden copular con las hembras (Pineda et al., 2017). Además, la activación de neuronas kisspeptinérgicas en el núcleo accumbens por el área ventral tegmental, también favorece la motivación sexual en ratas tratadas previamente con estradiol (Micevych et al., 2017) lo que refuerza nuestros resultados.

De manera adicional, paralelamente en un trabajo en humanos, se demostró que la kisspeptina incrementa la actividad en áreas del sistema límbico involucradas en el procesamiento de información sexual, lo cual es relevante porque dimensiona que el papel de la kisspeptina en la reproducción está preservado también en humanos (Yang et al., 2020).

Para reforzar parte de nuestros resultados sobre el efecto reforzante de la kisspeptina, se ha demostrado que cuando la conducta sexual es regulada tanto por hembras, como por machos, ésta resulta ser reforzante, evaluado mediante el paradigma de CPL (Jenkins & Becker, 2003; Paredes

& Alonso, 1997). Estos efectos podrían estar mediados por el sistema opioide donde se involucran sus receptores (MORs), que al bloquearse con naloxona (un antagonista de todos los receptores a opioides), inhibe el estado afectivo positivo (Camacho et al., 2004; García-Horsman et al., 2008; Paredes & Martínez, 2001). Además, el cambio en la preferencia de lugar obtenida con la cópula es similar a la sola administración de morfina (Paredes, 2014; Paredes & Alonso, 1997; Paredes & Vazquez, 1999).

En el caso de la kisspeptina, se ha encontrado tanto al mRNA del ligando como del receptor extrahipotalámico (donde principalmente regula funciones neuroendócrinas), en estructuras del sistema límbico, como son la amígdala y el núcleo accumbens (Muir et al., 2001). Lo cual podría indicar que la kisspeptina aparte de regular la función reproductiva por la estimulación de neuronas de GnRH, también podría mediar los efectos apetitivos y motivacionales de la cópula (Cominos et al., 2016).

La kisspeptina es una proteína que pertenece a la familia de las amidas RF (extremo terminal de arginina y fenilalanina), las cuales se encuentran altamente preservadas en mamíferos y algunos otros vertebrados (Jhamandas & Goncharuk, 2013) aunque en algunas especies se cambia el último residuo por tirosina (Y) (Tomikawa et al. 2009). Dicha pertenencia a esta gran familia de péptidos podría conferirle la capacidad de activar a otros receptores de otros péptidos homólogos debido a la semejanza estructural con otros ligandos de la familia de péptidos RF. Recientemente, se ha reportado que un derivado de la Kisspeptina-10, denominado Kissorfina, bloquea el efecto reforzante de la morfina (determinado mediante el paradigma de CPL) en ratas macho. Este derivado sintético pertenece al grupo de los péptidos NPFF, y puede unirse a sus receptores NPFF1 y NPFF2. Dicho efecto se ve bloqueado con la administración del antagonista RF9, con el cual también se ha demostrado que se bloquea el CPL inducido por la morfina (Gibula-Tarlowska, Grochecki, Silberring, & Kotlinska, 2019). Por otra parte, el péptido relacionado a RF1, (RFRP-1) induce un cambio evidente en el CPL cuando es administrado directamente en el núcleo central de la amígdala, efecto que también es revertido por el antagonista del receptor NPFF1; el RF9 (Lénárd et al., 2014).

Son muy pocos los estudios donde se habla del efecto reforzante directo (o ligado a la cópula) de los péptidos de la familia RF, y parecieran tener efectos opuestos, aún actuando sobre el mismo receptor NPFF. No hay estudios que demuestren que las kisspeptinas puedan unirse a los NPFF, o que la activación del GPR54 *per se* induzca un estado reforzante. En nuestros resultados encontramos que tanto la dosis de 7 nmol como la de 14 nmol produjeron un estado afectivo positivo comparado con el grupo control administrado sólo con solución salina. Lo que podría explicarse a través de que la kisspeptina es un péptido RF, y se ha encontrado en la amígdala, la cual adicionalmente de mediar respuestas aversivas o reforzantes, también está involucrada en procesos de aprendizaje y formación de memoria; procesos que son fundamentales para observar un cambio en el condicionamiento de preferencia de lugar (Hsu, Schroeder, & Packard, 2002). Estos se deben a que las ratas deben de recordar que en determinado compartimento experimentaron el EAP tras la administración del estímulo reforzante, dicha asociación ocurre mediante las pistas visuales, olfativas, y táctiles ya descritas, pues hay trabajos en donde si se bloquean los procesos de formación y consolidación de la memoria, no se expresa el CPL, incluso el adquirido con morfina (Fan et al., 2013).

Con los resultados obtenidos en nuestro experimento del CPL con CR y el antagonista de kisspeptina, proporcionamos evidencia clara sobre el bloqueo del EAP inducido por la CR al administrar el P234. Una posible explicación sería que al menos parcialmente el efecto reforzante de la cópula se encuentra mediado por la acción directa de kisspeptina. Esto va de acuerdo con el papel fundamental que juega la kisspeptina y su receptor en las funciones reproductivas, que abarcan desde las primeras etapas de desarrollo en la diferenciación sexual (Kauffman, Park, et al., 2007), hasta el inicio de la pubertad (Clarkson, 2013; Clarkson & Herbison, 2006) así como la regulación hormonal a lo largo de la vida modulando a su vez la conducta sexual de una manera muy importante (Kauffman, Clifton, & Steiner, 2007).

En conjunto, nuestros resultados arrojan firme evidencia del papel que tiene la kisspeptina en la activación de la receptividad sexual. Esto lo pudimos confirmar al bloquear selectivamente el receptor (con el P234) sobre el cual la kisspeptina ejerce su principal efecto.

En el presente trabajo nos encontramos con la limitación del confinamiento por la pandemia de COVID-19, y muchos experimentos tuvieron que aplazarse en el calendario, además de que hubiera sido favorable aumentar el número de ratas por experimento. Una de las perspectivas del proyecto de investigación es evaluar el efecto que tiene la kisspeptina en la conducta y recompensa sexual cuando sea administrado en núcleos cerebrales específicos a través de inyecciones estereotáxicas.

8 CONCLUSIONES

Conclusiones particulares:

- ❖ La Kp incrementó la intensidad de la lordosis comparada con los grupos control y E2 pero su administración junto con P4 indujo niveles de receptividad similares al grupo Control (E2 + P4).
- ❖ El efecto de la Kp fue parcialmente revertido cuando se administró junto con el antagonista (P234), obteniendo una intensidad de lordosis mayor al grupo E2 pero menor al grupo control, lo que evidencia el papel facilitatorio de la kisspeptina en la receptividad sexual.
- ❖ En la prueba de CPL ambas dosis administradas de Kisspeptina (7 y 14 nmol) incrementaron el tiempo pasado en el compartimento reforzado sin ser este efecto de manera dosis dependiente, lo cual sugiere que Kp induce *per se* un estado afectivo positivo.
- ❖ La administración de P234 redujo el tiempo en el compartimento reforzado con 30 min de cópula regulada.

Conclusión final:

- ❖ En ratas hembras pretratadas con E2, la administración de kisspeptina incrementa la receptividad sexual y además induce un estado afectivo positivo siendo este efecto bloqueado por su antagonista.



KISSEPTIN INDUCES A CONDITIONED PLACE PREFERENCE AND SEXUAL RECEPTIVITY IN FEMALE RATS

J. Hernandez¹, R. Paredes^{1,2}, M. Bedos².

¹ Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Mexico
² Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad Juriquilla, Querétaro, Mexico

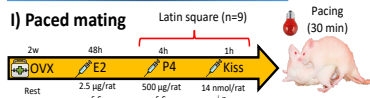


INTRODUCTION

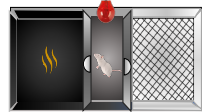
- Kisspeptin (Kiss), a potent regulator of the hypothalamic-pituitary-gonad axis, is also involved in other processes outside the hypothalamus, namely, the integration of sensory signals such as olfactory signals in rodents and the processing of the sexual and emotional information in humans.
- Kiss and its receptor (GPR54) are expressed in different brain regions known for their participation in the processing of reward and motivation of reinforcing behaviors.
- Paced mating induces a positive affective reward state as revealed by the conditioned place preference (CPP) paradigm.

METHODS

I) Paced mating



II) CPP

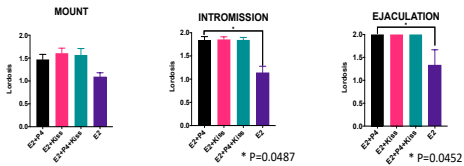


Session	Event	Min
1/8	Pretest / Test	10
2,4,6	No reinforcing	30
3,5,7	Reinforcing	30

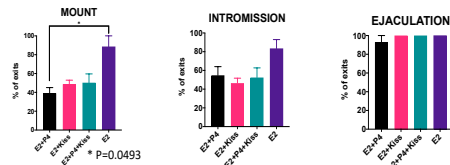
RESULTS

I) Kisspeptin increased lordosis intensity in females primed with estradiol

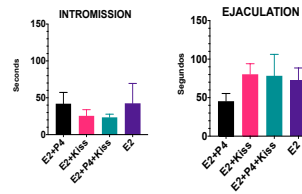
A) Lordosis intensity



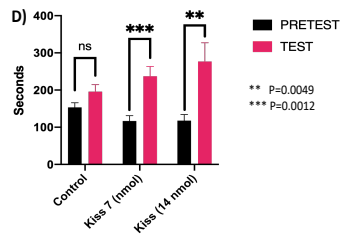
B) Exits from the male chamber



C) Time of return to the male chamber



II) Kisspeptin induced a conditioned place preference



CONCLUSIONS

- Our findings provide evidence that Kiss administrated with E2 induces a similar receptivity and response to males during paced mating as with the classic E2+P4 treatment.
- Females injected with Kiss developed a clear CPP, demonstrating its reinforcing properties.

Society for Neuroscience Global Connectome January 11 to 13 of 2021
 Research supported by grant DGAPA-UNAM IA207520

8.2 Presentación de trabajo en la AIBIR 2021



**ACADEMIA DE INVESTIGACIÓN EN
BIOLOGÍA DE REPRODUCCIÓN, A.C.**

Otorga la presente

Constancia a

Hernandez Ponce JE, Paredes RG, Bedos M.

Por la presentación del trabajo

**La kisspeptina induce un estado afectivo positivo y participa en
la receptividad sexual en ratas hembra**

En las actividades de la

46 Reunión Anual

Boca del Río, Ver., 24 de mayo de 2021.


Dra. Margarita Martínez Gómez
Presidenta
Consejo Directivo 2019-2021

10. REFERENCIAS

- Acosta-Martinez, M., & Etgen, A. M. (2002). Activation of μ -Opioid Receptors Inhibits Lordosis Behavior in Estrogen and Progesterone-Primed Female Rats. *Hormones and Behavior*, 41(1), 88-100. doi:<https://doi.org/10.1006/hbeh.2001.1741>
- Adekunbi, D. A., Li, X. F., Lass, G., Shetty, K., Adegoke, O. A., Yeo, S. H., . . . O'Byrne, K. T. (2018). Kisspeptin neurones in the posterodorsal medial amygdala modulate sexual partner preference and anxiety in male mice. *J Neuroendocrinol*, 30(3), e12572. doi:10.1111/jne.12572
- Aggarwal, S., Tang, C., Sing, K., Kim, H. W., Millar, R. P., & Tello, J. A. (2019). Medial Amygdala Kiss1 Neurons Mediate Female Pheromone Stimulation of Luteinizing Hormone in Male Mice. *Neuroendocrinology*, 108(3), 172-189. doi:10.1159/000496106
- Agmo, A. (1999). Sexual motivation--an inquiry into events determining the occurrence of sexual behavior. *Behav Brain Res*, 105(1), 129-150. doi:10.1016/s0166-4328(99)00088-1
- Albers-Wolthers, C. H. J., de Gier, J., Walen, M., van Kooten, P. J. S., Lambalk, C. B., Leegwater, P. A. J., . . . Kooistra, H. S. (2017). In vitro and in vivo effects of kisspeptin antagonists p234, p271, p354, and p356 on GPR54 activation. *PLoS One*, 12(6), e0179156-e0179156. doi:10.1371/journal.pone.0179156
- Alreja, M. (2013). Electrophysiology of kisspeptin neurons. *Adv Exp Med Biol*, 784, 349-362. doi:10.1007/978-1-4614-6199-9_16
- Arzate, Portillo, Rodriguez, Corona, & Paredes. (2011). Extended paced mating tests induces conditioned place preference without affecting sexual arousal. *Horm Behav*, 59(5), 674-680. doi:10.1016/j.yhbeh.2010.08.016
- Beach. (1942). Importance of Progesterone to Induction of Sexual Receptivity in Spayed Female Rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 51(3), 369-371. doi:10.3181/00379727-51-13979
- Beach. (1976). Sexual attractivity, proceptivity, and receptivity in female mammals. *Horm Behav*, 7(1), 105-138. doi:10.1016/0018-506x(76)90008-8
- Brailoiu, & Dun. (2005). KiSS-1 expression and metastatin-like immunoreactivity in the rat brain. *J Comp Neurol*, 481(3), 314-329. doi:10.1002/cne.20350
- Brunton, L. L., Lazo John S., Parker Keith L. . (2006). "Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la Terapéutica" . . Undécima. Edición. McGraw Hill.
- Camacho, F., Sandoval, C., & Paredes. (2004). Sexual experience and conditioned place preference in male rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 78(3), 419-425. doi:10.1016/j.pbb.2004.04.015
- Cattanach, B. M., Iddon, C. A., Charlton, H. M., Chiappa, S. A., & Fink, G. (1977). Gonadotrophin-releasing hormone deficiency in a mutant mouse with hypogonadism. *Nature*, 269(5626), 338-340. doi:10.1038/269338a0
- Clarkson, J. (2013). Effects of estradiol on kisspeptin neurons during puberty. *Front Neuroendocrinol*, 34(2), 120-131. doi:10.1016/j.yfrne.2013.02.002

- Clarkson, J., & Herbison, A. E. (2006). Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, *147*(12), 5817-5825. doi:10.1210/en.2006-0787
- Cominos, A. N., Anastasovska, J., Sahuri-Arisoylu, M., Li, X., Li, S., Hu, M., . . . Dhillon, W. S. (2016). Kisspeptin signaling in the amygdala modulates reproductive hormone secretion. *Brain Struct Funct*, *221*(4), 2035-2047. doi:10.1007/s00429-015-1024-9
- Cominos, A. N., Wall, M. B., Demetriou, L., Shah, A. J., Clarke, S. A., Narayanaswamy, S., . . . Dhillon, W. S. (2017). Kisspeptin modulates sexual and emotional brain processing in humans. *J Clin Invest*, *127*(2), 709-719. doi:10.1172/jci89519
- Constantin, S., Reynolds, D., Oh, A., Pizano, K., & Wray, S. (2021). Nitric oxide resets kisspeptin-excited GnRH neurons via PIP2 replenishment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *118*(1). doi:10.1073/pnas.2012339118
- Coopersmith, C., & Erskine, M. S. (1994). Influence of paced mating and number of intromissions on fertility in the laboratory rat. *J Reprod Fertil*, *102*(2), 451-458. doi:10.1530/jrf.0.1020451
- Delhousay, L., Chuon, T., Mittleman-Smith, M., Micevych, P., & Sinchak, K. (2019). *RP3V kisspeptin neurons mediate neuroprogesterone induction of the luteinizing hormone surge in female rat.*
- Dhillon, W. S., Chaudhri, O. B., Patterson, M., Thompson, E. L., Murphy, K. G., Badman, M. K., . . . Bloom, S. R. (2005). Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab*, *90*(12), 6609-6615. doi:10.1210/jc.2005-1468
- Doucette, W. T., Khokhar, J. Y., & Green, A. I. (2015). Nucleus accumbens deep brain stimulation in a rat model of binge eating. *Translational Psychiatry*, *5*(12), e695-e695. doi:10.1038/tp.2015.197
- Erskine, M. S. (1989). Solicitation behavior in the estrous female rat: a review. *Horm Behav*, *23*(4), 473-502. doi:10.1016/0018-506x(89)90037-8
- Faccio, L., Da Silva, A. S., Tonin, A. A., França, R. T., Gressler, L. T., Copetti, M. M., . . . Monteiro, S. G. (2013). Serum levels of LH, FSH, estradiol and progesterone in female rats experimentally infected by *Trypanosoma evansi*. *Experimental Parasitology*, *135*(1), 110-115. doi:<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.06.008>
- Fan, Y. D., Niu, H. C., Huma, T., Li, L., Wang, G. M., Xu, L. Q., . . . Yu, H. L. (2013). Blockage of glucocorticoid receptors during memory acquisition, retrieval and reconsolidation prevents the expression of morphine-induced conditioned place preferences in mice. *Dongwuxue Yanjiu*, *34*(E1), E26-34. doi:10.3724/sp.J.1141.2013.E01e26
- Fernandez-Fewell, G. D., & Meredith, M. (1998). Olfactory contribution to Fos expression during mating in inexperienced male hamsters. *Chem Senses*, *23*(3), 257-267. doi:10.1093/chemse/23.3.257
- Foreman, M. M., & Hall, J. L. (1987). Effects of D2-dopaminergic receptor stimulation on the lordotic response of female rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *91*(1), 96-100. doi:10.1007/bf00690934
- Gal, A., Lin, P.-C., Cacioppo, J. A., Hannon, P. R., Mahoney, M. M., Wolfe, A., . . . Ko, C. (2016). Loss of Fertility in the Absence of Progesterone Receptor Expression in Kisspeptin Neurons of Female Mice. *PLoS One*, *11*(7), e0159534. doi:10.1371/journal.pone.0159534

- García-Horsman, S. P., Agmo, A., & Paredes. (2008). Infusions of naloxone into the medial preoptic area, ventromedial nucleus of the hypothalamus, and amygdala block conditioned place preference induced by paced mating behavior. *Horm Behav*, 54(5), 709-716. doi:10.1016/j.yhbeh.2008.07.011
- García-Juárez, M., Montes-Narváez, O., Lima-Hernández, F. J., Domínguez-Ordoñez, R., Pfaus, J. G., & González-Flores, O. (2020). Tibolone facilitates lordosis behavior through estrogen, progestin, and GnRH-1 receptors in estrogen-primed rats. *Neuroscience Letters*, 736, 135299. doi:<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135299>
- Gibula-Tarłowska, E., Grochecki, P., Silberring, J., & Kotlinska, J. H. (2019). The kisspeptin derivative kissorphin reduces the acquisition, expression, and reinstatement of ethanol-induced conditioned place preference in rats. *Alcohol*, 81, 11-19. doi:10.1016/j.alcohol.2019.04.001
- Gonzalez-Flores, O., Beyer, C., Lima-Hernandez, F. J., Gomora-Arrati, P., Gomez-Camarillo, M. A., Hoffman, K., & Etgen, A. M. (2007). Facilitation of estrous behavior by vaginal cervical stimulation in female rats involves alpha1-adrenergic receptor activation of the nitric oxide pathway. *Behav Brain Res*, 176(2), 237-243. doi:10.1016/j.bbr.2006.10.007
- Goodman, R. L., Hileman, S. M., Nestor, C. C., Porter, K. L., Connors, J. M., Hardy, S. L., . . . Lehman, M. N. (2013). Kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin act in the arcuate nucleus to control activity of the GnRH pulse generator in ewes. *Endocrinology*, 154(11), 4259-4269. doi:10.1210/en.2013-1331
- Gresham, R., Li, S., Adekunbi, D. A., Hu, M., Li, X. F., & O'Byrne, K. T. (2016). Kisspeptin in the medial amygdala and sexual behavior in male rats. *Neurosci Lett*, 627, 13-17. doi:10.1016/j.neulet.2016.05.042
- Hardy, D. F., & DeBold, J. F. (1971). The relationship between levels of exogenous hormones and the display of lordosis by the female rat. *Hormones and Behavior*, 2(4), 287-297. doi:[https://doi.org/10.1016/0018-506X\(71\)90003-1](https://doi.org/10.1016/0018-506X(71)90003-1)
- He, W., Li, X., Adekunbi, D., Liu, Y., Long, H., Wang, L., . . . O'Byrne, K. T. (2017). Hypothalamic effects of progesterone on regulation of the pulsatile and surge release of luteinising hormone in female rats. *Scientific Reports*, 7(1), 8096. doi:10.1038/s41598-017-08805-1
- Helena. (2015). KNDy Neurons Modulate the Magnitude of the Steroid-Induced Luteinizing Hormone Surges in Ovariectomized Rats. *Endocrinology*, 156(11), 4200-4213. doi:10.1210/en.2015-1070
- Hellier, V., Brock, O., Candlish, M., Desroziers, E., Aoki, M., Mayer, C., . . . Bakker, J. (2018). Female sexual behavior in mice is controlled by kisspeptin neurons. *Nat Commun*, 9(1), 400. doi:10.1038/s41467-017-02797-2
- Herbison, A. E., de Tassigny, X., Doran, J., & Colledge, W. H. (2010). Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, 151(1), 312-321. doi:10.1210/en.2009-0552
- Hlinak, Z., & Madlafousek, J. (1977). Sexual Behaviour of the Female Laboratory Rat: Inventory, Patterning, and Measurement. *Behaviour*, 63(3-4), 129-173. doi:<https://doi.org/10.1163/156853977X00397>
- Hsu, E. H., Schroeder, J. P., & Packard, M. G. (2002). The amygdala mediates memory consolidation for an amphetamine conditioned place preference. *Behavioural Brain Research*, 129(1), 93-100. doi:[https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00376-X](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00376-X)

- Ishii, K. K., & Touhara, K. (2019). Neural circuits regulating sexual behaviors via the olfactory system in mice. *Neurosci Res*, 140, 59-76. doi:10.1016/j.neures.2018.10.009
- Jenkins, W. J., & Becker, J. B. (2003). Female rats develop conditioned place preferences for sex at their preferred interval. *Hormones and Behavior*, 43(4), 503-507. doi:[https://doi.org/10.1016/S0018-506X\(03\)00031-X](https://doi.org/10.1016/S0018-506X(03)00031-X)
- Jhamandas, J., & Goncharuk, V. (2013). Role of neuropeptide FF in central cardiovascular and neuroendocrine regulation. *Frontiers in endocrinology*, 4, 8. doi:10.3389/fendo.2013.00008
- Kang, N., Baum, M., & Cherry, J. (2009). A direct main olfactory bulb projection to the 'vomeronasal' amygdala in female mice selectively responds to volatile pheromones from males. *The European journal of neuroscience*, 29, 624-634. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.06638.x
- Karsch, F. J. (1987). Central Actions of Ovarian Steroids in the Feedback Regulation of Pulsatile Secretion of Luteinizing Hormone. *Annual Review of Physiology*, 49(1), 365-382. doi:10.1146/annurev.ph.49.030187.002053
- Katagiri, F., Kotani, M., Hirai, T., & Kagawa, J. (2015). The relationship between circulating kisspeptin and sexual hormones levels in healthy females. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 458(3), 663-666. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.02.021>
- Kauffman, A. S., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (2007). Emerging ideas about kisspeptin– GPR54 signaling in the neuroendocrine regulation of reproduction. *Trends in Neurosciences*, 30(10), 504-511. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.08.001>
- Kauffman, A. S., Park, J. H., McPhie-Lalmansingh, A. A., Gottsch, M. L., Bodo, C., Hohmann, J. G., . . . Rissman, E. F. (2007). The Kisspeptin Receptor GPR54 Is Required for Sexual Differentiation of the Brain and Behavior. *The Journal of Neuroscience*, 27(33), 8826. doi:10.1523/JNEUROSCI.2099-07.2007
- Kevetter, G. A., & Winans, S. S. (1981). Connections of the corticomедial amygdala in the golden hamster. I. Efferents of the "vomeronasal amygdala". *J Comp Neurol*, 197(1), 81-98. doi:10.1002/cne.901970107
- Kotani, M., Detheux, M., Vandenbogaerde, A., Communi, D., Vanderwinden, J. M., Le Poul, E., . . . Parmentier, M. (2001). The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem*, 276(37), 34631-34636. doi:10.1074/jbc.M104847200
- Kow, L. M., Florea, C., Schwanzel-Fukuda, M., Devidze, N., Kami Kia, H., Lee, A., . . . Pfaff, D. (2007). Development of a sexually differentiated behavior and its underlying CNS arousal functions. *Curr Top Dev Biol*, 79, 37-59. doi:10.1016/s0070-2153(06)79002-0
- Lauber, A. H., Romano, G. J., & Pfaff, D. W. (1991). Gene expression for estrogen and progesterone receptor mRNAs in rat brain and possible relations to sexually dimorphic functions. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 40(1), 53-62. doi:[https://doi.org/10.1016/0960-0760\(91\)90167-4](https://doi.org/10.1016/0960-0760(91)90167-4)
- Le, W. W., Attardi, B., Berghorn, K. A., Blaustein, J., & Hoffman, G. E. (1997). Progesterone blockade of a luteinizing hormone surge blocks luteinizing hormone-releasing hormone Fos activation and activation of its preoptic area afferents. *Brain Res*, 778(2), 272-280. doi:10.1016/s0006-8993(97)00971-2

- Lénárd, L., Kovács, A., Ollmann, T., Péczely, L., Zagoracz, O., Gálosi, R., & László, K. (2014). Positive reinforcing effects of RFamide-related peptide-1 in the rat central nucleus of amygdala. *Behav Brain Res*, 275, 101-106. doi:10.1016/j.bbr.2014.08.051
- Li, X.-F., Kinsey-Jones, J. S., Cheng, Y., Knox, A. M. I., Lin, Y., Petrou, N. A., . . . O'Byrne, K. T. (2009). Kisspeptin Signalling in the Hypothalamic Arcuate Nucleus Regulates GnRH Pulse Generator Frequency in the Rat. *PLoS One*, 4(12), e8334. doi:10.1371/journal.pone.0008334
- Long, N., Serey, C., & Sinchak, K. (2014). 17 β -estradiol rapidly facilitates lordosis through G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) via deactivation of medial preoptic nucleus μ -opioid receptors in estradiol primed female rats. *Hormones and Behavior*, 66(4), 663-666. doi:<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.09.008>
- Mahmoudi, F., Khazali, H., & Janahmadi, M. (2014). Interactions of Morphine and Peptide 234 on Mean Plasma Testosterone Concentration. *Int J Endocrinol Metab*, 12(1), e12554. doi:10.5812/ijem.12554
- Mannino, C. A., South, S. M., Inturrisi, C. E., & Quinones-Jenab, V. (2005). Pharmacokinetics and Effects of 17 β -Estradiol and Progesterone Implants in Ovariectomized Rats. *The Journal of Pain*, 6(12), 809-816. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpain.2005.07.007>
- Martinez, I., & Paredes. (2001). Only self-paced mating is rewarding in rats of both sexes. *Horm Behav*, 40(4), 510-517. doi:10.1006/hbeh.2001.1712
- Martini, M., Pradotto, M., & Panzica, G. (2011). Synergic effects of estradiol and progesterone on regulation of the hypothalamic neuronal nitric oxide synthase expression in ovariectomized mice. *Brain Research*, 1404, 1-9. doi:<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.06.017>
- Mayila, Y., Matsuzaki, T., Iwasa, T., Tungalagsuvd, A., Munkhzaya, M., Yano, K., . . . Irahara, M. (2020). The reduction in sexual behavior of adult female rats exposed to immune stress in the neonatal period is associated with reduced hypothalamic progesterone receptor expression. *General and Comparative Endocrinology*, 288, 113360. doi:<https://doi.org/10.1016/j.yggen.2019.113360>
- McCarthy, E. A., Maqsudlu, A., Bass, M., Georghiou, S., Cherry, J. A., & Baum, M. J. (2017). DREADD-induced silencing of the medial amygdala reduces the preference for male pheromones and the expression of lordosis in estrous female mice. *Eur J Neurosci*, 46(4), 2035-2046. doi:10.1111/ejn.13636
- Meerts, S. H., Boisvert, E. M., Spjut, K. A., & Clark, A. S. (2010). Paced mating behavior persists in rats with vaginocervical Lidocaine. *Physiol Behav*, 99(1), 139-141. doi:10.1016/j.physbeh.2009.10.010
- Mermelstein, P. G., & Becker, J. B. (1995). Increased extracellular dopamine in the nucleus accumbens and striatum of the female rat during paced copulatory behavior. *Behavioral Neuroscience*, 109(2), 354-365. doi:10.1037/0735-7044.109.2.354
- Micevych. (2013). Temporal and concentration-dependent effects of oestradiol on neural pathways mediating sexual receptivity. *Journal of neuroendocrinology*, 25(11), 1012-1023. doi:10.1111/jne.12103
- Micevych. (2017). Integrating Neural Circuits Controlling Female Sexual Behavior. *Front Syst Neurosci*, 11, 42. doi:10.3389/fnsys.2017.00042

- Micevych, Mermelstein, P., & Sinchak, K. (2017). Estradiol Membrane-Initiated Signaling in the Brain Mediates Reproduction. *Trends in Neurosciences*, 40(11), 654-666. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.09.001>
- Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., & Caron, M. G. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*, 78(1), 189-225. doi:10.1152/physrev.1998.78.1.189
- Mittelman-Smith, Wong, & Micevych. (2018). Estrogen and Progesterone Integration in an in vitro Model of RP3V Kisspeptin Neurons. *Neuroendocrinology*, 106(2), 101-115. doi:10.1159/000471878
- Muir, A. I., Chamberlain, L., Elshourbagy, N. A., Michalovich, D., Moore, D. J., Calamari, A., . . . Harrison, D. C. (2001). AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem*, 276(31), 28969-28975. doi:10.1074/jbc.M102743200
- Navarro, V. M., Castellano, J. M., Fernandez-Fernandez, R., Tovar, S., Roa, J., Mayen, A., . . . Tena-Sempere, M. (2005). Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology*, 146(1), 156-163. doi:10.1210/en.2004-0836
- Nilsson, M. E., Vandenput, L., Tivesten, Å., Norlén, A.-K., Lagerquist, M. K., Windahl, S. H., . . . Ohlsson, C. (2015). Measurement of a Comprehensive Sex Steroid Profile in Rodent Serum by High-Sensitive Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Endocrinology*, 156(7), 2492-2502. doi:10.1210/en.2014-1890
- Olds, J., & Milner, P. (1955). Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of the rat brain. *Journal of comparative and physiological psychology*, 47, 419-427. doi:10.1037/h0058775
- Paredes. (2009). Evaluating the Neurobiology of Sexual Reward. *ILAR Journal*, 50(1), 15-27. doi:10.1093/ilar.50.1.15
- Paredes. (2014). Opioids and sexual reward. *Pharmacol Biochem Behav*, 121, 124-131. doi:10.1016/j.pbb.2013.11.004
- Paredes, & Alonso, A. (1997). Sexual behavior regulated (paced) by the female induces conditioned place preference. *Behav Neurosci*, 111(1), 123-128. doi:10.1037//0735-7044.111.1.123
- Paredes, & Martinez, I. (2001). Naloxone blocks place preference conditioning after paced mating in female rats. *Behav Neurosci*, 115(6), 1363-1367.
- Paredes, & Vazquez, B. (1999). What do female rats like about sex? Paced mating. *Behav Brain Res*, 105(1), 117-127. doi:10.1016/s0166-4328(99)00087-x
- Peirce, J. T., & Nuttall, R. L. (1961). Duration of sexual contacts in the rat. *J Comp Physiol Psychol*, 54, 585-587. doi:10.1037/h0047468
- Pfaus. (1992). μ -, δ -, and κ -opioid receptor agonists selectively modulate sexual behaviors in the female rat: Differential dependence on progesterone. *Hormones and Behavior*, 26(4), 457-473. doi:[https://doi.org/10.1016/0018-506X\(92\)90014-M](https://doi.org/10.1016/0018-506X(92)90014-M)
- Pfaus. (1995). Sexual activity increases dopamine transmission in the nucleus accumbens and striatum of female rats. *Brain Research*, 693(1), 21-30. doi:[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00679-K](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00679-K)

- Pfaus. (2015). Chapter 50 - Female Sexual Behavior. In T. M. Plant & A. J. Zeleznik (Eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition)* (pp. 2287-2370). San Diego: Academic Press.
- Pineda. (2010). Critical roles of kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist. *Endocrinology*, *151*(2), 722-730. doi:10.1210/en.2009-0803
- Pineda, Plaisier, Millar, & Ludwig. (2017). Amygdala Kisspeptin Neurons: Putative Mediators of Olfactory Control of the Gonadotropic Axis. *Neuroendocrinology*, *104*(3), 223-238. doi:10.1159/000445895
- Radahmadi, M., Ramshini, E., Hosseini, N., Karimi, S., & Alaei, H. (2014). Effect of electrical stimulation of nucleus accumbens with low, median and high currents intensities on conditioned place preference induced by morphine in rats. *Adv Biomed Res*, *3*, 14. doi:10.4103/2277-9175.124643
- Roa, J., Vigo, E., Castellano, J. M., Gaytan, F., García-Galiano, D., Navarro, V. M., . . . Tena-Sempere, M. (2008). Follicle-stimulating hormone responses to kisspeptin in the female rat at the preovulatory period: modulation by estrogen and progesterone receptors. *Endocrinology*, *149*(11), 5783-5790. doi:10.1210/en.2008-0604
- Roseweir. (2009). Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. *J Neurosci*, *29*(12), 3920-3929. doi:10.1523/jneurosci.5740-08.2009
- Roseweir, & Millar. (2013). Kisspeptin antagonists. *Adv Exp Med Biol*, *784*, 159-186. doi:10.1007/978-1-4614-6199-9_8
- Sachs, B. D. (1997). Erection Evoked in Male Rats by Airborne Scent from Estrous Females. *Physiology & Behavior*, *62*(4), 921-924. doi:[https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(97\)00307-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(97)00307-7)
- Saedi, S., Khoradmehr, A., Mohammad Reza, J. S., & Tamadon, A. (2018). The role of neuropeptides and neurotransmitters on kisspeptin/kiss1r-signaling in female reproduction. *J Chem Neuroanat*, *92*, 71-82. doi:10.1016/j.jchemneu.2018.07.001
- Sanathara, N. M., Moreas, J., Mahavongtrakul, M., & Sinchak, K. (2014). Estradiol Upregulates Progesterone Receptor and Orphanin FQ Colocalization in Arcuate Nucleus Neurons and Opioid Receptor-Like Receptor-1 Expression in Proopiomelanocortin Neurons That Project to the Medial Preoptic Nucleus in the Female Rat. *Neuroendocrinology*, *100*(2-3), 103-118. doi:10.1159/000363324
- Semaan, S. J., Tolson, K. P., & Kauffman, A. S. (2013). The development of kisspeptin circuits in the Mammalian brain. *Adv Exp Med Biol*, *784*, 221-252. doi:10.1007/978-1-4614-6199-9_11
- Seminara, S. B., Messenger, S., Chatzidaki, E. E., Thresher, R. R., Acierno, J. S., Jr., Shagoury, J. K., . . . Colledge, W. H. (2003). The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med*, *349*(17), 1614-1627. doi:10.1056/NEJMoa035322
- Shaw, Histed, Srouji, Yang, Lee, & Hall. (2010). Estrogen negative feedback on gonadotropin secretion: evidence for a direct pituitary effect in women. *J Clin Endocrinol Metab*, *95*(4), 1955-1961. doi:10.1210/jc.2009-2108

- Sinchak, & Micevych. (2001). Progesterone blockade of estrogen activation of mu-opioid receptors regulates reproductive behavior. *J Neurosci*, *21*(15), 5723-5729. doi:10.1523/jneurosci.21-15-05723.2001
- Skorupskaite, K., George, J. T., & Anderson, R. A. (2014). The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease. *Hum Reprod Update*, *20*(4), 485-500. doi:10.1093/humupd/dmu009
- Slob, A. K., & van der Werff Ten Bosch, J. J. (1998). Sex differences in body growth in the rat. *Physiology & Behavior*, *14*(3), 353-361. doi:[https://doi.org/10.1016/0031-9384\(75\)90044-X](https://doi.org/10.1016/0031-9384(75)90044-X)
- Smith. (1975). The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*, *96*(1), 219-226. doi:10.1210/endo-96-1-219
- Smith. (2005). Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*, *146*(9), 3686-3692. doi:10.1210/en.2005-0488
- Södersten, P., & Hansen, S. (1979). Induction of sexual receptivity by oestradiol benzoate in cyclic female rats: influence of ovarian secretions before injection of oestradiol benzoate. *Journal of Endocrinology*, *80*(3), 389-395. doi:10.1677/joe.0.0800389
- Stephens, S. B. Z. (2017). Regulation and Possible Functions of Kisspeptin in the Medial Amygdala. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *8*, 191. doi:10.3389/fendo.2017.00191
- 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. *Hormones and Behavior*, *55*(1), 93-97. doi:10.1016/j.yhbeh.2008.08.012
- Tennent, B. J., Smith, E. R., & Davidson, J. M. (1980). The effects of estrogen and progesterone on female rat proceptive behavior. *Hormones and Behavior*, *14*(1), 65-75. doi:[https://doi.org/10.1016/0018-506X\(80\)90016-1](https://doi.org/10.1016/0018-506X(80)90016-1)
- Teodorov, E., Camarini, R., Bernardi, M. M., & Felicio, L. F. (2014). Treatment with steroid hormones and morphine alters general activity, sexual behavior, and opioid gene expression in female rats. *Life Sci*, *104*(1-2), 47-54. doi:10.1016/j.lfs.2014.03.021
- Tonn Eisinger, K. R., Larson, E. B., Boulware, M. I., Thomas, M. J., & Mermelstein, P. G. (2018). Membrane estrogen receptor signaling impacts the reward circuitry of the female brain to influence motivated behaviors. *Steroids*, *133*, 53-59. doi:10.1016/j.steroids.2017.11.013
- Trevisan, C. M., Montagna, E., de Oliveira, R., Christofolini, D. M., Barbosa, C. P., Crandall, K. A., & Bianco, B. (2018). Kisspeptin/GPR54 System: What Do We Know About Its Role in Human Reproduction? *Cell Physiol Biochem*, *49*(4), 1259-1276. doi:10.1159/000493406
- Ulaş Aytürk, N., firat, T., Kukner, A., ÖZoğUl, C., Töre, F., Kandirali, E., & Yilmaz, B. (2017). The effect of kisspeptin on spermatogenesis and apoptosis in rats. *TURKISH JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES*, *47*, 334-342. doi:10.3906/sag-1505-69
- Vreeburg, J. T., & Ooms, M. P. (1985). Induction of ear wiggling in the estrous female rat by gonadectomized rats treated with androgens and estrogens. *Horm Behav*, *19*(3), 231-236. doi:10.1016/0018-506x(85)90023-6

- Weems, P. W., Witty, C. F., Amstalden, M., Coolen, L. M., Goodman, R. L., & Lehman, M. N. (2016). κ -Opioid Receptor Is Colocalized in GnRH and KNDy Cells in the Female Ovine and Rat Brain. *Endocrinology*, *157*(6), 2367-2379. doi:10.1210/en.2015-1763
- Whalen, R. E. (1974). Estrogen-progesterone induction of mating in female rats. *Horm Behav*, *5*(2), 157-162. doi:10.1016/0018-506x(74)90040-3
- Wolfe, A., & Hussain, M. A. (2018). The Emerging Role(s) for Kisspeptin in Metabolism in Mammals. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *9*, 184. doi:10.3389/fendo.2018.00184
- Yang, Comminos, & Dhillon. (2018). Intrinsic links among sex, emotion, and reproduction. *Cell Mol Life Sci*, *75*(12), 2197-2210. doi:10.1007/s00018-018-2802-3
- Yang, Demetriou, L., Wall, M., Mills, E., Zargaran, D., Sykes, M., . . . Dhillon, W. (2020). Kisspeptin enhances brain responses to olfactory and visual cues of attraction in men. *JCI Insight*, *5*(3). doi:10.1172/jci.insight.133633
- Yeo. (2016). Visualisation of Kiss1 Neurone Distribution Using a Kiss1-CRE Transgenic Mouse. *J Neuroendocrinol*, *28*(11). doi:10.1111/jne.12435
- Yoest, K. E., Cummings, J. A., & Becker, J. B. (2019). Ovarian Hormones Mediate Changes in Adaptive Choice and Motivation in Female Rats. *Front Behav Neurosci*, *13*, 250. doi:10.3389/fnbeh.2019.00250
- Zipse, L. R., Brandling-Bennett, E. M., & Clark, A. S. (2000). Paced mating behavior in the naturally cycling and the hormone-treated female rat. *Physiol Behav*, *70*(1-2), 205-209. doi:10.1016/s0031-9384(00)00242-0