



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA**

**Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta  
Posgrado en Ciencias Naturales**

Participación de la cinasa Src y el receptor de estrógeno  
en la activación de la conducta de estro, inducida  
por diversos agentes en la rata

# **T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES**

Presenta:

**Francisco Javier Lima Hernández**

Comité Tutorial

**Director: Dr. Oscar González Flores**

**Tutores: Dra. Margarita Martínez Gómez  
Dr. José Ramón Eguibar Cuenca**

El presente trabajo de tesis fue realizado bajo la dirección del Dr. Oscar González Flores y la tutoría de la Dra. Margarita Martínez Gómez y el Dr. José Ramón Eguibar Cuenca. El trabajo experimental se desarrolló en las instalaciones del Centro de Investigación en Reproducción Animal (CINVESTAV-Universidad Autónoma de Tlaxcala), ubicado en Panotla, Tlaxcala.

Todo el trabajo de investigación para la presente tesis fue posible realizarlo, gracias a los apoyos financieros del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) del Dr. Oscar González Flores con clave de convenio No. CB-2009-C01-134291 y del Programa de Cuerpos Académicos de la Universidad Autónoma de Tlaxcala clave CACyPI UAT-2014.



Universidad Autónoma de Tlaxcala  
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado  
Posgrado en Ciencias Biológicas



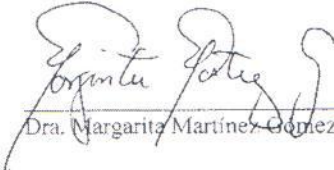
POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

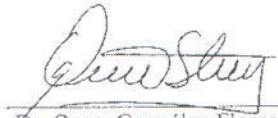
COORDINACIÓN DEL DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA  
P R E S E N T E


Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que el estudiante **Francisco Javier Lima Hernández**, realizará para la obtención del grado de **Doctor en Ciencias Naturales**, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen profesional correspondiente. El título que llevará es **“Participación de la cinasa Src y el receptor de estrógeno en la activación de la conducta de estro, inducida por diversos agentes en la rata”**.

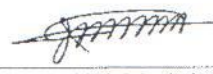
Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
Tlaxcala, Tlax., septiembre 2 de 2014

  
Dra. Margarita Martínez Gómez

  
Dr. Oscar González Flores

  
Dr. Kurt Leroy Hoffinan Tiber

  
Dr. Angel I. Melo Salazar

  
Dr. Porfirio Gómera Arrati

  
Dr. Marcos García Juárez



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado Bajo la Norma:  
ISO 9001:2000-NMX-CC-9001-IMNC-2000



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070 Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: [posgradoctbcuat@gmail.com](mailto:posgradoctbcuat@gmail.com)  
Tlaxcala, Tlax.

## **AGRADECIMENTOS**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, a sus directivos Dra. Margarita Martínez Gómez, Dr. Jorge Rodríguez Antolín, Dra. Yolanda Cruz Gómez, por todas las facilidades otorgadas a mi persona para la terminación del doctorado. A la maestra Socorro y a Rebeca por su constante asesoría para que cumpliera los requisitos del doctorado. Agradezco al los apoyos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) No. CB-2009-C01-134291 y del Programa de Cuerpos Académicos de la Universidad Autónoma de Tlaxcala clave CACyPI UAT-2014, sin los cuales no hubiera sido posible la realización de la presente tesis.

Al Jurado Evaluador:

Dra. Margarita Martínez Gómez

Dr. Oscar González Flores

Dr. Kurt Leroy Hoffman Tiber

Dr. Angel I. Melo Salazar

Dr. Porfirio Gómora Arrati

Dr. Marcos García Juárez

Por su invaluable tiempo para la revisión de esta tesis.

Al Dr. José Ramón Eguibar Cuenca por sus precisas observaciones y sugerencias durante el desarrollo del presente trabajo.

Al Dr. Carlos Beyer in memoriam y a la Dra. Gabriela González Mariscal por permitirme ser parte del CIRA.

A todos mis compañeros y amigos del CIRA sin su ayuda no hubiera sido posible terminar esta etapa de mi vida.

Quiero hacer una mención especial al Dr. Oscar González Flores no solo por ser un gran amigo, sino por demostrarlo durante todo el tiempo que hemos trabajado juntos. Gracias por todo tu apoyo y tolerancia.



**DEDICATORIAS**

A DIOS

A MIS PADRES

Y A MI FAMILIA

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como propósito el probar la hipótesis de la participación de la vía de señalización Src y del receptor de estrógenos, sobre la facilitación de la conducta de estro en ratas ovariectomizadas (Ovx) previamente estrogenizadas con benzoato de estradiol (5µg de BE). Los agentes inductores de la conducta de estro fueron: progesterona y sus progestinas (5β-DHP, 5β,3β-Pgl, 5α-DHP, 5α, 3α-Pgl), GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas), prostaglandina E2 o la estimulación vaginocervical (EVC). Para probar esta hipótesis se utilizaron ratas Sprague-Dawley (Ovx), las cuales fueron implantadas en el intracerebroventricularmente (icv). Para iniciar el experimento los animales recibieron 5µg de BE por vía subcutánea 40 horas antes de la aplicación de los agentes antes mencionados o la EVC. Se diseñaron dos series de experimentos: en la primera serie se realizaron tres experimentos para determinar la participación de la cinasa Src, para lo cual se aplicó un inhibidor específico de la familia de la cinasa Src, el 4-amino-5-(4-clorofenil) -7 - (t-butil) pirazolo [3,4-d] pirimidina (PP2); en la segunda serie se realizaron cuatro experimentos; en los primeros tres se usó la administración de tamoxifen [modulador del receptor de estrógeno (RE)]. En el cuarto experimento para comprobar la participación del RE, se exploró el efecto de un antagonista puro del RE el ICI18278 (ICI) sobre el comportamiento de estro inducido por la progesterona (P) y la GnRH.

Los resultados mostraron que todos los compuestos químicos (aplicados icv) o la aplicación de la EVC, facilitaron la conducta de estro en algunos de los tiempos probados, cuando ésta fue evaluada utilizando machos expertos a los 60, 120 y 240 min.

Referente a la primera serie de experimentos los resultados muestran que cuando los animales fueron infundidos con 30 µg de PP2 (30 min antes de la aplicación de los agentes o la EVC), significativamente se redujo el comportamiento de estro inducido por 5β-DHP, 5β,3β-Pgl, GnRH, PGE2 o por la EVC.

Los resultados de la segunda serie de experimentos mostraron que la infusión icv de tamoxifen (5µg) 30 minutos antes de la aplicación de los agentes o la EVC, disminuyeron en forma significativa la conducta de estro inducida por P, en la mayoría de los metabolitos 5α- y 5β-

reducidos, GnRH y PGE2. Pero en el caso de hembras tratadas con la progestina 5 $\beta$ -DHP o la EVC, aunque se observa una tendencia hacia la disminución de la conducta de estro con la aplicación de tamoxifen ésta no fue significativa. Además, en el experimento en el cual a las hembras se les infundió icv el ICI, se muestra una disminución significativa del comportamiento de estro inducido por la P y la GhRH.

Los resultados de la presente investigación sugieren que el sistema de señalización Src, participa en la facilitación de la conducta de estro en ratas inducidas por diferentes agentes que no presentan afinidad por el RP y que la activación de este sistema requiere la presencia del receptor de estrógeno. Además, se sugiere que la activación del RE, participa con un efecto de disparo sobre el comportamiento de estro inducido por agentes con estructuras diferentes que no se unen directamente al RE.

## ÍNDICE

Página

|   |    |
|---|----|
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b>  | 1  |
| 1.1. La conducta de estro en roedores   | 1  |
| 1.1.1. Atractividad   | 1  |
| 1.1.2. Proceptividad.   | 1  |
| 1.1.3. Receptividad.  | 1  |
| 1.2. Regulación neuroendocrina de la conducta de estro en la rata.                                      | 2  |
| 1.3. Regulación neural de la conducta sexual femenina en roedores.                                      | 3  |
| 1.3.1. Cerebro anterior   | 4  |
| 1.3.2. Hipotálamo.  | 6  |
| 1.3.3. Mescencéfalo.  | 6  |
| 1.3.4. Tallo cerebral bajo.   | 6  |
| 1.3.5. Médula espinal.  | 7  |
| 1.4. Estructura y función del receptor de Progesterona  | 7  |
| 1.4.1. Metabolismo de la Progesterona a progestinas reducidas en el Anillo A                            | 9  |
| 1.4.2. Correlación entre la expresión del RP y la inducción de la conducta sexual femenina en roedores. | 11 |
| 1.5. El receptor de estrógenos.   | 11 |
| 1.5.1. Estructura del receptor de estrógeno   | 12 |
| 1.5.2. Distribución de los receptores de estrógenos alfa y beta en el cerebro                           | 14 |
| 1.5.3. Efectos genómicos del receptor de estrógeno.   | 15 |
| 1.5.4. Efectos no genómicos del receptor de estrógeno.  | 16 |
| 1.5.5. Antiestrógenos.  | 16 |
| 1.5.5.1. Tipo I o moduladores selectivos del receptor de estrógeno.                                     | 16 |
| 1.5.5.2. Tipo II o puros  | 18 |
| 1.6. Control neuroquímico sobre la regulación de la conducta  |    |



|   |    |
|---|----|
| sexual femenina en roedores.  | 18 |
| 1.6.1 Prostaglandina E <sub>2</sub> .   | 19 |
| 1.6.2. Hormona liberadora de gonadotropinas.  | 21 |
| 1.6.3. Estimulación vaginocervical.   | 23 |
| 1.7. Fosforilación de proteínas   | 24 |
| 1.7.1. Proteínas cinasas  | 26 |
| 1.7.2. Proteínas fosfatasas   | 27 |
| 1.7.3. Fosfoproteínas   | 27 |
| 1.8. La cinasa Src.   | 28 |
| 1.8.1. Historia del descubrimiento de la Src.   | 28 |
| 1.8.2. Estructura y activación de la Src  | 29 |
| 1.8.3. Funciones de la cinasa Src   | 30 |
| 1.9. La comunicación cruzada en la activación de la conducta de estro   | 31 |
| <b>2. ANTECEDENTES</b>  | 35 |
| <b>3. JUSTIFICACIÓN</b>   | 37 |
| <b>4. HIPÓTESIS</b>   | 38 |
| <b>5. OBJETIVOS</b>   | 39 |
| 5.1. Objetivo General.  | 39 |
| 5.2. Objetivos Particulares.  | 39 |
| <b>6. METODOLOGÍA</b>   | 40 |
| 6.1. Animales.  | 40 |
| 6.2. Cirugías.  | 40 |
| 6.3. Fármacos.  | 40 |
| 6.4. Evaluación de la conducta sexual femenina.   | 41 |
| 6.5. Comprobación del área de implante.   | 41 |
| 6.6. Diseño experimental.   | 41 |
| 6.6.1. Experimento 1: efecto del PP2 sobre el comportamiento de estro inducido por 5 $\beta$ -DHP o 5 $\beta$ , 3 $\beta$ -Pgl. | 41 |

|   |    |
|---|----|
| 6.6.2. Experimento 2: efecto de PP2 sobre el comportamiento de estro inducido por GnRH y PGE2.  | 42 |
| 6.6.3. Experimento 3: efecto de PP2 sobre el comportamiento de estro inducido por estimulación manual de los flancos más la estimulación vaginocervical.      | 42 |
| 6.6.4. Experimento 4: efecto del tamoxifen sobre el comportamiento de estro inducido por P y 5 $\alpha$ - y 5 $\beta$ -progestinas reducidas.                 | 43 |
| 6.6.5. Experimento 5: efecto del tamoxifen sobre el comportamiento de estro inducido por la GnRH y PGE2.  | 43 |
| 6.6.6. Experimento 6: efecto del tamoxifen sobre el comportamiento de estro inducido por la estimulación vaginocervical.                                      | 43 |
| 6.6.7. Experimento 7: efecto del ICI, un antagonista puro del receptor de estrógeno, sobre el comportamiento de estro inducido por la Progesterona y la GnRH. | 44 |
| 6.7. Análisis estadístico   | 44 |
| <b>7. RESULTADOS</b>  | 45 |
| 7.1. Experimento 1: efecto del PP2 sobre el comportamiento de estro inducido por 5 $\beta$ -DHP o 5 $\beta$ , 3 $\beta$ -Pgl.                                 | 45 |
| 7.2. Experimento 2: efecto de PP2 sobre el comportamiento de estro inducido por la GnRH y PGE2.   | 47 |
| 7.3. Experimento 3: efecto de PP2 sobre el comportamiento de estro inducido por la estimulación manual de los flancos más la estimulación vaginocervical.     | 49 |
| 7.4. Experimento 4: efecto del tamoxifen sobre el comportamiento de estro inducido por P y 5 $\alpha$ - y 5 $\beta$ -progestinas reducidas.                   | 51 |
| 7.5. Experimento 5: efecto del tamoxifen sobre el comportamiento de estro inducido por la GnRH y PGE2.  | 54 |
| 7.6. Experimento 6: efecto del tamoxifen sobre el comportamiento de estro inducido por la estimulación vaginocervical.  | 56 |

|  |    |
|--|----|
| 7.7. Experimento 7: efecto del ICI, un antagonista puro del receptor de estrógeno sobre el comportamiento de estro inducido por la progesterona y la GnRH. | 58 |
| <b>8. DISCUSIÓN</b>  | 60 |
| <b>9. CONCLUSIONES</b>   | 68 |
| <b>10. PERSPECTIVAS</b>  | 69 |
| <b>11. REFERENCIAS</b>   | 70 |
| <b>12. PUBLICACIONES</b>   | 98 |

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como propósito el probar la hipótesis de la participación de la vía de señalización Src y del receptor de estrógenos, sobre la facilitación de la conducta de estro en ratas ovariectomizadas (Ovx) previamente estrogenizadas con benzoato de estradiol (5µg de BE). Los agentes inductores de la conducta de estro fueron: progesterona y sus progestinas (5β-DHP, 5β,3β-Pgl, 5α-DHP, 5α, 3α-Pgl), GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas), prostaglandina E2 o la estimulación vaginocervical (EVC). Para probar esta hipótesis se utilizaron ratas Sprague-Dawley (Ovx), las cuales fueron implantadas en el intracerebroventricularmente (icv). Para iniciar el experimento los animales recibieron 5µg de BE por vía subcutánea 40 horas antes de la aplicación de los agentes antes mencionados o la EVC. Se diseñaron dos series de experimentos: en la primera serie se realizaron tres experimentos para determinar la participación de la cinasa Src, para lo cual se aplicó un inhibidor específico de la familia de la cinasa Src, el 4-amino-5-(4-clorofenil)-7-(t-butil)pirazolo [3,4-d] pirimidina (PP2); en la segunda serie se realizaron cuatro experimentos; en los primeros tres se usó la administración de tamoxifen [modulador del receptor de estrógeno (RE)]. En el cuarto experimento para comprobar la participación del RE, se exploró el efecto de un antagonista puro del RE el ICI18278 (ICI) sobre el comportamiento de estro inducido por la progesterona (P) y la GnRH.

Los resultados mostraron que todos los compuestos químicos (aplicados icv) o la aplicación de la EVC, facilitaron la conducta de estro en algunos de los tiempos probados, cuando ésta fue evaluada utilizando machos expertos a los 60, 120 y 240 min.

Referente a la primera serie de experimentos los resultados muestran que cuando los animales fueron infundidos con 30 µg de PP2 (30 min antes de la aplicación de los agentes o la EVC), significativamente se redujo el comportamiento de estro inducido por 5β-DHP, 5β,3β-Pgl, GnRH, PGE2 o por la EVC.

Los resultados de la segunda serie de experimentos mostraron que la infusión icv de tamoxifen (5µg) 30 minutos antes de la aplicación de los agentes o la EVC, disminuyeron en forma significativa la conducta de estro inducida por P, en la mayoría de los metabolitos 5α- y 5β-



reducidos, GnRH y PGE2. Pero en el caso de hembras tratadas con la progestina 5 $\beta$ -DHP o la EVC, aunque se observa una tendencia hacia la disminución de la conducta de estro con la aplicación de tamoxifen ésta no fue significativa. Además, en el experimento en el cual a las hembras se les infundió icv el ICI, se muestra una disminución significativa del comportamiento de estro inducido por la P y la GhRH.

Los resultados de la presente investigación sugieren que el sistema de señalización Src, participa en la facilitación de la conducta de estro en ratas inducidas por diferentes agentes que no presentan afinidad por el RP y que la activación de este sistema requiere la presencia del receptor de estrógeno. Además, se sugiere que la activación del RE, participa con un efecto de disparo sobre el comportamiento de estro inducido por agentes con estructuras diferentes que no se unen directamente al RE.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. La conducta de estro en roedores**

Beach (1976) distingue tres componentes de la conducta sexual femenina o de estro, los cuales son: la atractividad, la proceptividad y la receptividad. Así, las conductas precopulatorias de atractividad y proceptividad indican el grado de motivación que presenta la hembra hacia el macho, mientras que la receptividad se refiere al componente ejecutorio o consumatorio de la cópula, que en la rata hembra se manifiesta por la lordosis. El mismo autor describe las características de estos tres componentes de la conducta estral.

#### **1.1.1. Atractividad**

Incluye aquellas cualidades que ayudan al macho a identificar a una hembra en estro, considera cambios morfológicos y fisiológicos, por ejemplo, cambios en la coloración del área genital y la producción de secreciones que contienen sustancias odoríferas denominadas feromonas (Carr y cols. 1965).

#### **1.1.2. Proceptividad.**

Se refiere al conjunto de patrones motores estereotipados que la hembra dirige hacia el macho y que constituyen su iniciativa para establecer o mantener la interacción sexual, estimulándolo para la ejecución de la monta y la intromisión.

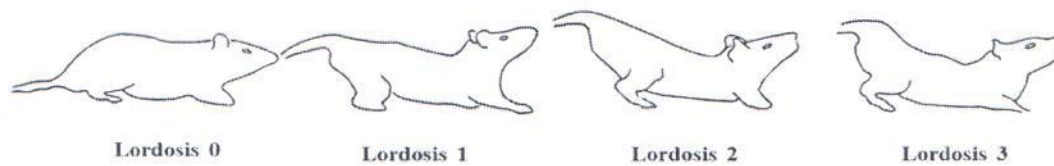
En la rata es posible observar tres patrones de conductas proceptivas que son:

- 1.- Brincoteo: son saltos pequeños que efectúa la hembra sobre sus cuatro patas para finalizar agazapada.
- 2.- Arrancones: son carreras cortas en zig zag que terminan con la inmovilidad de la hembra.
- 3.- Orejeo: que se presenta por un movimiento de alta frecuencia de la cabeza sobre su plano horizontal.

#### **1.1.3. Receptividad.**

Se refiere a la conducta en la cual la hembra arquea la columna dorsolumbar y eleva la región perineal moviendo lateralmente la cola, esta conducta es conocida como el reflejo de lordosis, con el la hembra coloca la vagina en una posición accesible a la intromisión penéana (Beach 1942, Morali y cols. 1976, Pfaff y cols. 1980) y la eyaculación (Beach 1942). Para su cuantificación se evalúa el cociente de lordosis (índice cuantitativo de la receptividad sexual de

la hembra), que resulta de dividir el número de lordosis entre el número de montas del macho (Beach 1942, Medlofouseck y Hlinak 1978) y la intensidad de la lordosis que mide el grado de arqueamiento mostrado por la hembra en cada monta y que alcanza valores de 0 a 3 (Hardy y De Bold 1972 Fig.1).

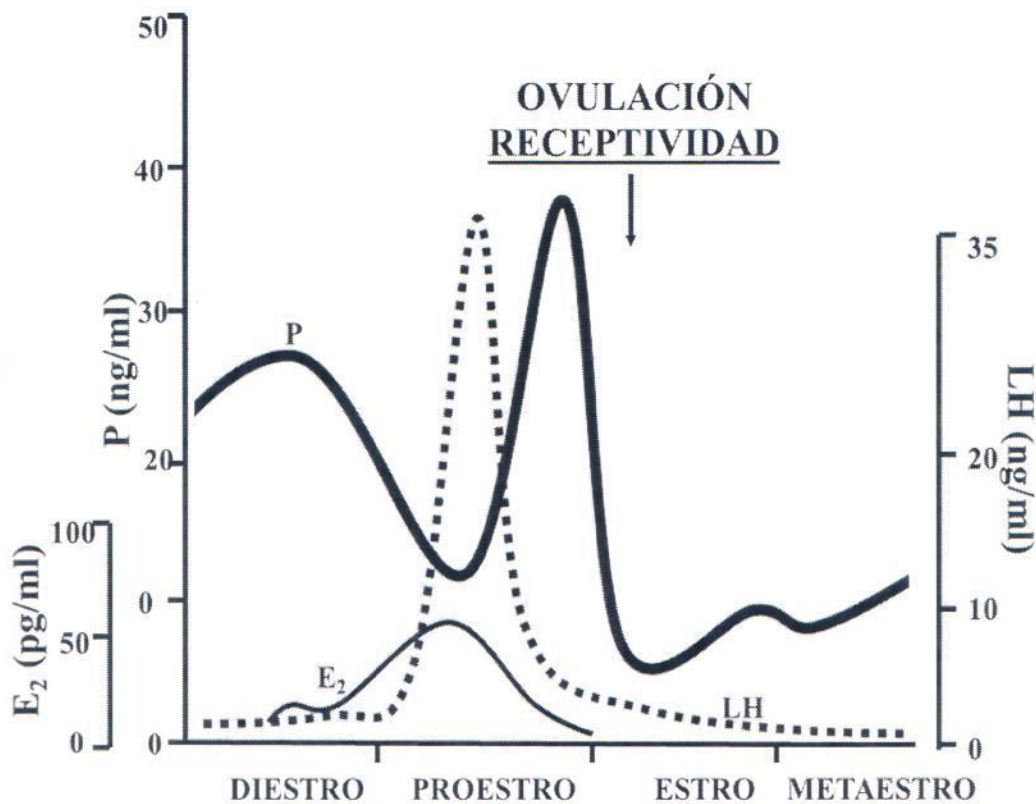


**Figura 1. Características de la intensidad de la lordosis.** Se observa la intensidad de la lordosis que despliega la hembra en respuesta a la monta ejecutada por el macho (Modificada de Pfaff 1980).

### 1.2. Regulación neuroendocrina de la conducta de estro en la rata.

Los ovarios son glándulas reproductivas que secretan estradiol y progesterona (P). La tasa de secreción de estradiol (estrógeno más potente) al plasma es baja en el estro, comienza a incrementarse en el diestro y alcanza concentraciones máximas en la tarde del proestro (Butcher y cols. 1974). Por su parte, la concentración plasmática de P presenta un incremento durante la tarde y la noche del proestro (Smith y cols. 1975), siendo esta secreción de origen folicular además de ocurrir de manera similar con la descarga de la hormona luteinizante, con lo cual se asegura la ovulación. Una vez ocurrida ésta, se observa en el plasma un segundo incremento en la concentración de P, la cual es producida por el cuerpo lúteo formado como consecuencia de la ovulación; tal aumento se observa desde la tarde del metaestro hasta la mañana del diestro (Pfaff 1980, Freeman 1994, Blaustein y Erskine 2002 Fig. 2); coincidiendo estas fluctuaciones con los valores plasmáticos de estradiol y P; así, se ha mostrado que la máxima receptividad sexual se presenta en la rata durante la tarde del proestro, concluyendo que la exposición secuencial al estradiol y la P en la rata hembra, tiene una función determinante en la expresión de la conducta sexual (Moralí y Beyer 1979, Pfaff 1980, Blaustein y Erskine 2002).





**Figura 2. Patrón de secreción hormonal durante el ciclo ovárico de la rata.** Se puede observar el periodo en el cual ocurre la receptividad sexual y la ovulación en relación a las concentraciones hormonales (tomado de Butcher y cols. 1974) E<sub>2</sub> = estradiol; P= progesterona; LH= hormona luteinizante.

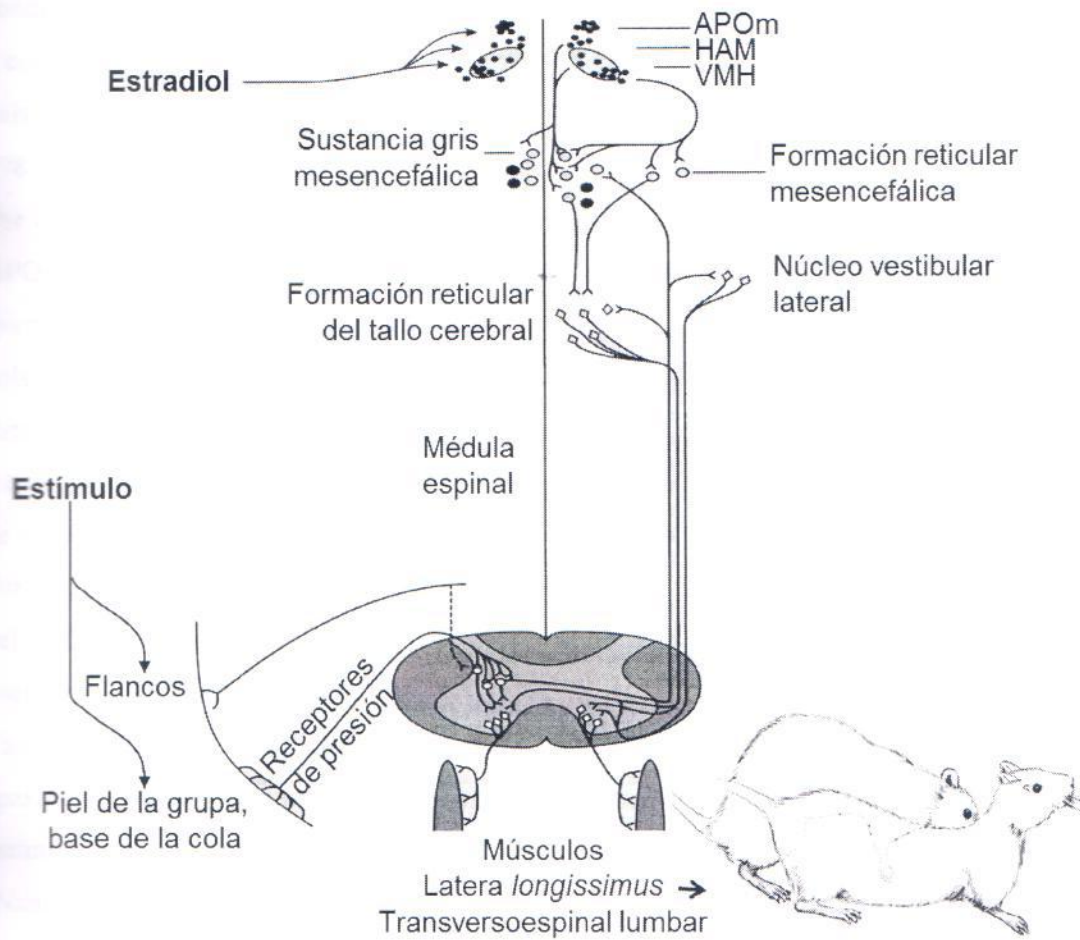
Se ha encontrado en varias especies de roedores (p.ej. rata, cuyo, hámster), que la remoción de los ovarios abate la expresión de la conducta de estro y que la administración de estradiol seguida (24,48 o 72 horas después) de P, la restaura (Edwards y cols. 1968, Clemens y Weaver 1985).

### 1.3. Regulación Neural de la conducta sexual femenina en roedores.

Con el uso de técnicas de estimulación eléctrica, de lesión de regiones cerebrales específicas, implantación de hormonas, etc., se han logrado definir las áreas del cerebro relacionadas con la **facilitación** y la **inhibición** de la conducta sexual femenina, en diferentes especies de roedores.



Se ha dividido el cerebro en varios módulos o subdivisiones relacionadas con la regulación de dicha conducta, los cuales incluyen: el cerebro anterior, hipotálamo, mesencéfalo, la parte baja del tallo cerebral y la médula espinal (Pfaff, 1980, Pfaff y cols. 1994 Fig. 3).



**Figura 3. Características neuroanatómicas de la activación de la conducta de lordosis de la rata.** La monta del macho estimula los receptores de presión en los flancos, la base de la cola y el periné, a través de las vías ascendentes se estimula el hipotálamo ventromedial lugar donde las hormonas actúan para facilitar la conducta. Las vías descendentes van al cerebro medio, a la formación reticular del tallo cerebral, al núcleo vestibular lateral y a la sustancia gris central mesencefálica, facilitando la actividad de las motoneuronas, responsables de producir la contracción de los músculos lateral longissimus y transversoespinal lumbar, ocasionando que el reflejo de la lordosis se presente. (Modificado de Pfaff y cols. 1994, APOm, área preóptica medial, HAM, Hipotálamo antero medial, HVM, Hipotálamo ventromedial).

**1.3.1. Cerebro Anterior.-** Esta parte del cerebro ejerce efectos inhibitorios sobre el reflejo de lordosis. Dentro de esta zona se localiza el APOm, el septum, el bulbo olfatorio; de tal forma que, la lesión del APOm en la rata hembra adulta Ovx facilita la receptividad sexual, mientras que su estimulación eléctrica la inhibe. Este efecto se acompaña de un incremento en las conductas de rechazo (Law y Meagher 1958, Singer 1968, Powers y Valenstein 1972, Malsbury y cols. 1981). En la hembra hamster, las lesiones en esta área no muestran efecto (Malsbury y cols. 1977); sin embargo, la estimulación eléctrica disminuye la lordosis (Malsbury y cols. 1981).

Por otro lado, implantes de estradiol y P, en forma de cristales aplicados directamente en el APOm, restauran el reflejo de lordosis en hembras OVX. Este mismo efecto se observa con microdepósitos oleosos de P, en ratas OVX pretratadas con inyecciones de estradiol (Beyer y cols. 1989, Beyer y González-Mariscal 1995).

Estos resultados son difíciles de interpretar ya que existen axones provenientes de estructuras telencefálicas que pasan a través del APOm y que se dirigen al tallo cerebral. La interrupción de estas vías, por una desaferentación dorsal del APOm, aumenta la expresión de la lordosis. Por ello, se ha especulado que el incremento en la conducta de lordosis, provocado por la lesión del APOm, podría deberse a la destrucción de las fibras de paso, más que a la destrucción de los cuerpos celulares locales.

También, lesiones electrolíticas del septum lateral incrementan la conducta de lordosis en ratas, aparentemente por incrementar la respuesta neuronal al estrógeno y a la P. Sin embargo, la estimulación eléctrica de esta área en la hembra hámster, previene el despliegue de la lordosis (Nance y cols. 1975, Ahdieh y cols. 1986).

Otra área cerebral que se ha propuesto como inhibitoria de la conducta de estro, es el bulbo olfatorio, ya que se ha observado que la remoción quirúrgica de esta área, en ratas tratadas únicamente con estrógeno (Moss 1971) y con estrógeno más P (McGinnis y cols. 1978), provoca un incremento de la conducta de lordosis.

**1.3.2. Hipotálamo.-** En esta área se encuentran los núcleos del hipotálamo ventromedial (HVM) y al área tegmental ventral (ATV). El HVM tiene una función importante en la facilitación de la conducta de estro en ratas (Singer 1968, Dörner y cols. 1969), hamsters (Malsbury y cols.



1977) y cuyos (Brookhart y cols. 1941, Dey y cols. 1942), con ciclos estrales normales o en hembras OVX, pretratadas con estradiol y P. Así, la estimulación eléctrica del HVM facilita la lordosis en ratas pretratadas con dosis bajas de benzoato de estradiol (Pfaff y Sakuma 1979). Sin embargo, las lesiones o estimulaciones aplicadas en el HVM no reducen o activan la conducta sexual de manera inmediata, ya que se requieren periodos prolongados de estimulación, para que se observe la lordosis; de la misma manera, para que se produzca la inhibición se requiere de varias horas posterior a la lesión (Pfaff y Sakuma 1980). Además, lesiones en el núcleo habenular o en la estría medular también reducen las conductas proceptivas y la receptividad en ratas OVX tratadas con estrógenos (Rodgers y Law 1967, Modianos y cols. 1975).

Por otro lado, en la hembra hamster se ha observado que se requiere la activación tanto del HVM como del ATV, para que la hembra exprese la conducta de lordosis (DeBold y Malsbury 1989, Frye y DeBold 1993).

**1.3.3. Mescencéfalo.-** Comprende a la sustancia gris central (SGC) y la formación reticular mesencefálica (FRM). Estas regiones reciben las señales que provienen de las fibras descendentes del HVM y las transfieren a las neuronas reticuloespinales de la parte más baja del tallo cerebral. La lesión total de la SGC ocasiona la inhibición inmediata de la lordosis en ratas OVX tratadas con estrógenos y P (Hennesey y cols. 1990). Además, la estimulación eléctrica de esta área cerebral facilita la expresión de la conducta de lordosis en ratas OVX pretratadas sólo con estradiol (Sakuma y Pfaff 1979).

**1.3.4. Tallo cerebral bajo.-** En esta región se procesa la información relativa a la postura del animal y su integridad, indispensable para que se realice con éxito el reflejo de lordosis durante la monta del macho. Las fibras del tallo cerebral, descienden a la médula espinal a través de los tractos espinovestibulares y reticuloespinales. De manera que la ablación completa de estos tractos, provocan que la rata sea incapaz de ejecutar el reflejo de lordosis.

Con el empleo de técnicas de autorradiografía e inmunocitoquímica, se ha determinado que el APOm, HVM y partes de la sustancia gris central, tienen neuronas que poseen receptores a los estrógenos y a la P.

**1.3.5. Médula espinal.-** Esta área recibe la mayoría de la información somatosensorial que ocurre durante la cópula. La lordosis es disparada por la entrada sensorial que recibe la hembra en los flancos, la grupa y la región perineal. Se conoce que la estimulación vaginocervical a ratas Ovx y tratadas con estrógenos, puede sustituir el efecto lordogénico inducido por la P. En esta zona, se genera la información motora que induce la postura de lordosis; por lo tanto, las hembras con lesiones en los cordones espinales no logran realizar el arqueamiento de la columna vertebral.

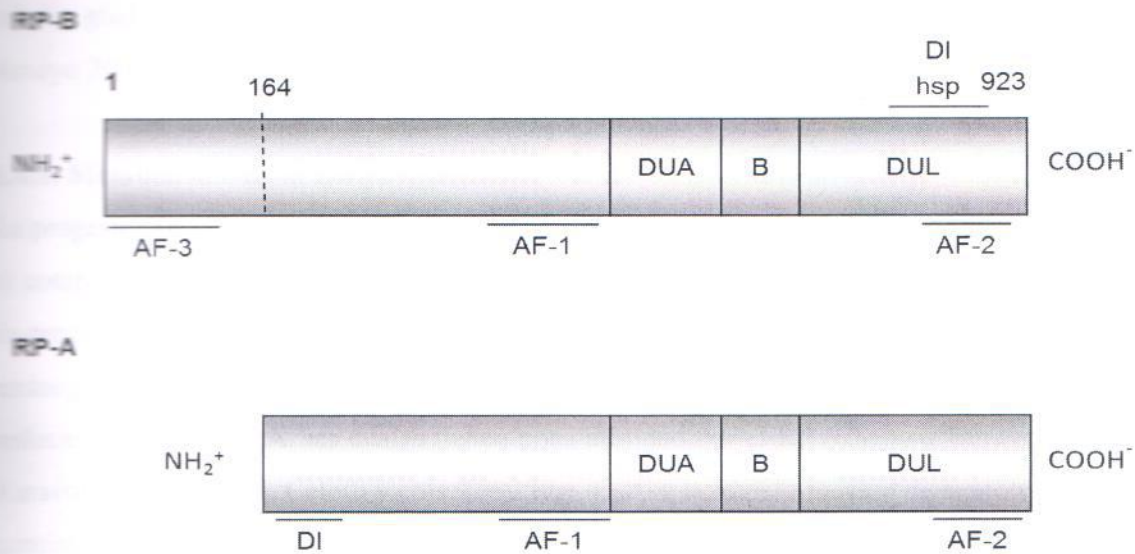
Podemos concluir que las áreas relacionadas con la facilitación de la conducta sexual, son aquellas que se encuentran en la región diencefálica, como el HVM o el hipotálamo anterior (HA), así como la SGC o la habénula; mientras que, las estructuras relacionadas con la inhibición de la conducta de lordosis, son aquellas áreas cerebrales que se encuentran más rostrales, como el APOm, el septum y el bulbo olfatorio. Por lo tanto, la estimulación así como la lesión de estas áreas causan efectos opuestos a los observados en las áreas hipotalámicas o del cerebro medio.

#### **1.4. Estructura y función del receptor de P (RP)**

Se conoce que la P lleva a cabo sus acciones progestacionales a través de la unión con el RP, el cual es un factor de transcripción que pertenece a la superfamilia de receptores a hormonas esteroideas, tiroideas, ácido retinoico y vitamina D, entre otros.

El RP se caracteriza por tener cuatro dominios funcionales: el dominio A/B: regula la transcripción de genes blanco, ya que este dominio contiene las funciones de transactivación (AF1 y AF2); el dominio C participa en la dimerización y en la unión con el ADN por medio de dos dedos de zinc existentes en la proteína, esta es la región más conservada del RP; el dominio D participa en los procesos de estabilización del receptor cuando se une a proteínas de choque térmico y también en la localización nuclear de este receptor, a esta región se le conoce como región de bisagra; el dominio E localizado en el extremo carboxilo terminal del receptor, participa en la interacción con el ligando y activa los mecanismos de transactivación (Camacho-Arroyo 2003 Fig. 5).





**Figura 4. Diferentes isoformas del receptor a progesterona (RP).** La isoforma B contiene 164 aa más que la isoforma A. Además, en la B se encuentra un factor de activación (AF), que no se encuentra en la isoforma A. Modificado de Edwards (1999).

En aves, roedores y mamíferos se han caracterizado dos isoformas del RP denominadas RP-A (86-90 KDa) y RP-B (110-120 KDa), la diferencia entre éstas es de 164 aminoácidos presentes en el extremo amino-terminal de RP-B. En humanos, ambas isoformas de los RP son codificadas por el mismo gen, pero sintetizadas a partir de distintos sitios promotores (Giangrande y McDonnell 1999).

A pesar de tener afinidad similar por diversos agonistas y antagonistas las isoformas del RP regulan diferentes genes y tienen funciones distintas. Así, por lo general el RP-B actúa como un activador transcripcional en diversos contextos celulares, mientras que el RP-A no activa la transcripción, pero funciona como un fuerte represor de la actividad transcripcional mediada tanto por el RP-B, y otros receptores a hormonas esteroideas (estrógenos, glucocorticoides, mineralocorticoides y andrógenos McDonnell y Goldman 1994). Lo anterior es debido a que el RP-A, tiene mayor afinidad por correpresores como el SMRT, en cambio el RP-B, tiene afinidad por coactivadores, p.e. SRC-1 (Giangrande y McDonnell 1999). En el sistema nervioso central (SNC) de diversas especies de mamíferos, el RP se ha detectado tanto en neuronas como en

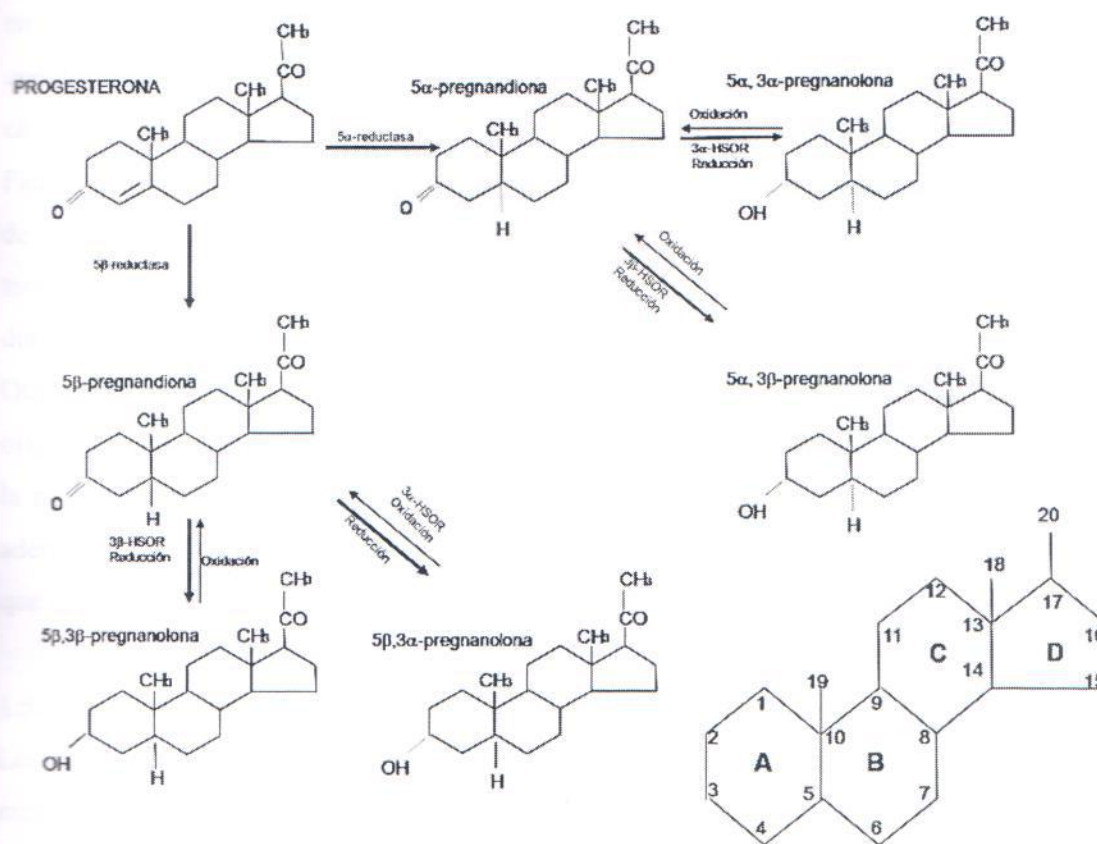
células gliales de prácticamente todas las regiones cerebrales de hembras y machos (Camacho-Arroyo 2003).

#### **1.4.1. Metabolismo de la P a progestinas reducidas en el Anillo A.**

La progesterona (P) actúa sobre las neuronas del hipotálamo ventromedial (HVM), para facilitar el comportamiento de estro (lordosis y proceptividad) en ratas, a través de unirse a el receptor de progesterona (RP, Barfield y cols. 1984, Etgen 1984, Mani y cols. 1997, Blaustein 2003). Sin embargo, la P es rápidamente metabolizada en el cerebro a una variedad de progestinas reducidas en el anillo A, las cuales tienen poca afinidad por el RP (Cheng y Karavolas 1973, Karavolas y cols. 1984, Celotti y cols. 1992 Fig. 4). Así, la transformación de la molécula de P, consiste en una reducción del anillo A en el carbono 5 (i.e., incorporación de un hidrógeno en el carbono 5 y la pérdida de la doble ligadura que se encuentra entre los carbonos 4 y 5). Este cambio en la estructura de la P genera dos progestinas, denominadas  $5\alpha$  o  $5\beta$  dihidroprogesterona ( $5\alpha$ -DHP,  $5\beta$ -DHP o pregnandionas), a partir de las cuales se producen las llamadas pregnanolonas ( $5\alpha$ - $3\alpha$ -pregnanolona o  $5\alpha$ - $3\beta$ -pregnanolona;  $5\beta$ - $3\beta$ -pregnanolona o  $5\beta$ - $3\alpha$ -pregnanolona.), por la reducción, ahora en el carbono 3 del anillo A (Cheng y Karavolas 1973, Karavolas y cols. 1984). Estos cambios enzimáticos inactivan los efectos progestacionales de la P, en algunos tejidos, por ejemplo en el útero, debido a que las reducciones en el anillo A disminuyen la unión o afinidad por el RP principalmente las de configuración beta (Smith y cols. 1974, Raynaud y cols. 1982, Rupprecht y cols. 1993). Sin embargo, las progestinas reducidas en el anillo A, cuando son administradas dentro del cerebro o en los ventrículos cerebrales, son más potentes que la P en inducir el comportamiento sexual en ratas hembras previamente estrogenizadas (Beyer y cols. 1988, González-Flores y cols. 2006). La unión de estas progestinas por el RP, es mucho menor que la unión hacia la P, pero en cambio, poseen la capacidad de interactuar con los receptores de algunos neurotransmisores (p. ej., GABA, Glicina, glutamato) dando una respuesta mucho mayor que la ejercida por la P. Nuestro grupo ha sido líder en explorar la participación de estos agentes, sobre la conducta de estro, en ratas estrogenizadas. Así, nosotros mostramos que tanto la administración intracerebral, como la intravenosa, de estas progestinas, indujeron intensa conducta de estro. Además, con el uso de curvas dosis-respuesta encontramos que todas las progestinas reducidas en el anillo A, fueron



más potentes que la P para inducir la conducta de estro. (Beyer y cols. 1988, González-Flores y cols. 2006). Nosotros también estudiamos los mecanismos celulares por los cuales estos metabolitos inducen dicha conducta. Así, encontramos que las progestinas pueden inducir lordosis a través de la activación indirecta del RP, ya que la antiprogestina RU486 (antagonista del RP) bloqueó su efecto lordogénico. Además, ahora se sabe que sus efectos pueden ser generados a través de varias vías de señalización intracelular como son: la vía del AMPc-PKA, MAPK y la vía del Óxido Nítrico-GMPc-PKG (González-Flores y Etgen 2004, González-Flores y cols. 2004, 2006).



**Figura 5.** Reducciones de la P<sub>4</sub> en el anillo A. Las flechas gruesas señalan los cambios metabólicos más comunes, mientras que las delgadas señalan cambios metabólicos reversibles. Modificado de Karavolas y Hodges, (1990).

#### **1.4.2. Correlación entre la expresión del RP y la inducción de la conducta sexual femenina en roedores.**

A partir de los hallazgos que muestran que el estradiol ( $E_2$ ) induce la expresión del RP, en áreas cerebrales como el HVM y el APOm relacionadas con la inducción de la conducta sexual femenina en roedores (MacLusky y McEwen 1978), se desarrollaron un número considerable de investigaciones para estudiar la correlación temporal entre la inducción de la expresión del RP por estrógenos y la aparición de dicha conducta después del tratamiento con P. Experimentos realizados por Moguilewski y Reynaud (1979) en ratas Ovx, demostraron que los niveles máximos en la facilitación de la conducta sexual por P y en la inducción de la expresión del RP en el hipotálamo, fueron obtenidos de 24 a 48 horas después del tratamiento con  $E_2$ , mientras que la sola administración de  $E_2$  fue inefectiva en inducir lordosis 12 horas después, así como en incrementar los niveles del RP. En un trabajo realizado en el cobayo hembra, Blaustein y Feder (1979) encontraron que la aparición del RP en el HVM y en el APOm, precede al inicio de la conducta de apareamiento, inducida por P, en hembras pretratadas con  $E_2$ , encontrando también, una considerable reducción en la expresión del RP, en las mismas áreas cerebrales durante el periodo refractario de la conducta sexual (inhibición secuencial).

Otros estudios mostraron que la administración del RU486 (antagonista del RP), así como del oligonucleótido antisentido para el RNA mensajero del RP (el cual interfiere con la síntesis de la proteína), en el HVM de hembras OVX, inhibieron la conducta de estro inducida por P, además de disminuir la expresión del receptor (Pollio y cols. 1993). En ratones hembra knockout que no expresan el RP, tampoco presentan conducta de lordosis inducida por P.

#### **1.5. El receptor de estrógenos**

Los estrógenos cumplen una función vital en la fisiología reproductiva, tanto femenina como masculina, estimulando el crecimiento y diferenciación celular en tejido mamario, útero, vagina, ovario, testículos, epidídimo y próstata. Así mismo, son de gran importancia en la fisiología cardiovascular, el balance de la energía, la temperatura, la formación de hueso, los ritmos circadianos y el estrés, también proporcionan neuroprotección en caso de enfermedades neurodegenerativas y traumatismos (Gustafsson 2003, 2006, Brann y cols. 2007, Simpkins y cols. 2012, Handa y cols. 2012). Además, sobre las funciones cognitivas, los  $E_2$  muestra un



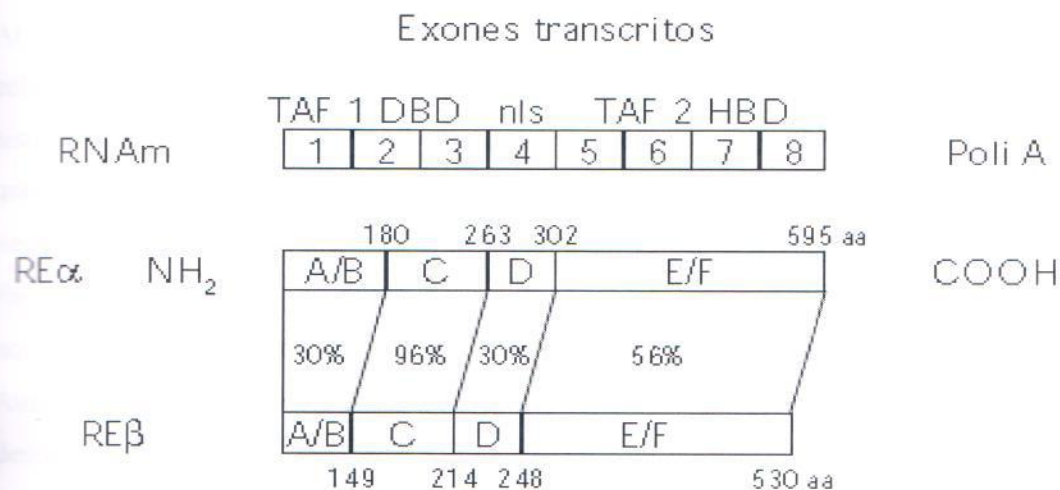
impacto significativo en procesos relacionados con plasticidad neuronal, ya que, diversos estudios han mostrado que el E<sub>2</sub> generado en el SNC (neuroesteroide) puede modular la actividad de diferentes sistemas de neurotransmisores incluyendo el serotoninérgico, dopaminérgico, adrenérgico y colinérgico (Luine 1985, McEwen y Alves 1999, Sellix y cols. 2004). Con respecto a la mediación del comportamiento sexual y reproductivo, se sabe que el E<sub>2</sub> producido por el ovario, señala el estado endocrino de las gónadas hacia el cerebro, activa los circuitos que regulan la ovulación y el comportamiento sexual (Pfaff 1994, Beyer y cols. 1988). Siendo el hipotálamo un área cerebral importante, ya que regula la liberación de hormonas ováricas (E y P), para inducir la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH; Herbison y Pape 2001, Micevich y Kelly 2012).

### **1.5.1. Estructura del Receptor de Estrógeno**

El receptor de estrógeno (RE) es una proteína perteneciente al grupo de la “súper familia de receptores nucleares”, la cual incluye también otro tipo de receptores como los de hormonas esteroideas, el receptor de la vitamina D, retinoides, hormona tiroidea y algunos receptores huérfanos (Evans 1988). El receptor de estrógeno fue identificado por Jensen y Jacobson (1962) quienes describieron la presencia de sitios de unión de estrógeno en diferentes tejidos de ratas. Cuatro años después, Toft y Gorski (1966) aislaron por primera vez receptores de estrógeno del útero de ratas. Ambos grupos desarrollaron distintos modelos, para explicar el mecanismo por el cual, el estradiol lleva a cabo su acción a nivel del núcleo, al unirse a su receptor específico el RE. Desde entonces, el RE a sido ampliamente estudiado. Así, hace pocos años se pensaba que todos los efectos debidos a estrógenos, eran mediados por un solo RE, sin embargo, en 1996 fue descubierto un nuevo receptor, que comparte gran homología con el RE conocido y se decidió denominarlos entonces RE- $\beta$  (Kuiper y cols. 1996) al recientemente descubierto y RE $\alpha$  al previamente conocido. Como consecuencia, esto incrementó la complejidad de la fisiología de los estrógenos con sus receptores, ya que ambos receptores poseen funciones diferentes de acuerdo al tejido donde ejercen su acción.

Funcionalmente, el RE $\alpha$ , al igual que el resto de los receptores esteroideos, está organizado en 4 dominios identificados por letras de la “A” a la “F”. El domonio A/B está localizada en el extremo amino terminal (Fig. 6) de la proteína y es el menos conservado entre los distintos

receptores nucleares. Este dominio contiene una función de activación de la transcripción genética (del inglés: Activation Function 1 o AF-1) y varios sitios de fosforilación, que son importantes en el proceso de activación de la proteína especialmente en los procesos donde el receptor es activado en ausencia de hormona (Ignar-Trowbridge y cols. 1992, Pietras y cols. 1995). Adyacente se encuentra la región de unión al ADN o dominio C, compuesta por nueve residuos de cisteínas que son invariablemente conservados entre los diferentes receptores esteroideos, de los cuales, ocho están coordinados alrededor de dos iones de  $Zn^{2+}$  para formar dos dedos de zinc que le confieren al receptor la capacidad de unirse específicamente al ADN. La unión a una secuencia específica en el ADN está determinada por la composición de aminoácidos localizada entre estos dos dedos de zinc, conocida como la caja P (P-box Freedman 1992).



**Fig. 6. Estructura del receptor de estrógenos.** Los números interiores del RNAm corresponden a los exones y las letras interiores a las regiones funcionales. En la proteína, las letras interiores señalan las diferentes regiones del receptor y los números exteriores corresponden al número de aminoácidos (AA). Los porcentajes representan el grado de homología entre los dominios de las dos isoformas del RE (modificado de Ogawa 1998). TAF1 y TAF2: factor de activación transcripcional. DBD: dominio de unión al DNA. NLS: Señal de localización nuclear. HBD: dominio de unión a la hormona.

Entre la región de unión al ADN y el dominio E/F, se encuentra la región D o región de bisagra, la cual no ha sido bien caracterizada y participa en la unión a la proteína chaperona de choque



térmico hsp90 (del inglés: heat shock protein 90), permaneciendo unida al receptor mientras éste se encuentre en un estado inactivo. Finalmente, en el extremo carboxilo terminal se encuentra la región E/F o dominio de unión al ligando (LBD), donde se une la hormona. Esta región, a pesar que es conservada entre los diferentes receptores esteroideos, es altamente específica para su hormona, es decir que el receptor de estrógeno une estrógeno con alta afinidad, pero no otras hormonas esteroideas. Otras funciones de este dominio incluyen la función de activación de la transcripción o AF-2 (del inglés: Activation Function 2), la dimerización, la interacción con otras proteínas co-activadoras o co-represoras de la transcripción, la fosforilación y la localización nuclear (Montano y cols. 1995, Koide y cols. 2007).

#### **1.5.2. Distribución de los receptores de estrógenos alfa y beta en el cerebro**

Através de autorradiografía y ensayos de unión in vitro, se ha demostrado una alta densidad de células que concentran RE en una variedad de estructuras cerebrales como el hipotálamo y el sistema límbico (Pfaff 1968, Warembourg 1977, Rainbow y cols. 1982). La localización exacta que tienen estos receptores es importante para el correcto entendimiento de la función que desempeñan, ya que los RE $\alpha$  y RE $\beta$  tienen distintos patrones de expresión a través del cerebro. En algunos casos, ambos se presentan en localizaciones idénticas en neuronas individuales, pero no en otras (Simerly 1990, Greco y cols. 2001).

Aunque no son exclusivos de estas zonas, los RE $\alpha$  mRNA o su proteína están expresados densamente por todo el lecho del núcleo de la estria terminal, en la parte posterodorsal y núcleo cortical de la amígdala, en el área preóptica media y periventricular, además, del núcleo arqueado, hipotálamo ventromedial y periventricular, también la parte ventral del septum lateral y la sustancia gris central de cerebro medio (Simerly y cols. 1990, Shughrue y cols. 1997, Merchenthaler y cols. 2004).

Algunas de las diferencias más notables entre la distribución de los RE $\alpha$  y RE $\beta$  son encontradas en el núcleo paraventricular y supraóptico, el cual es rico en RE $\beta$  mRNA con RE $\alpha$  mRNA casi no detectable. El RE $\beta$  es abundante en el área preóptica media, en el lecho del núcleo de la estria terminal, amígdala media, núcleo ventromedial del hipotálamo, sustancia gris central y el tegumento ventral. Los RE $\alpha$  y RE $\beta$  son expresados altamente en sistema límbico (tálamo,

hipotálamo, hipocampo, amígdala cerebral, el núcleo amigdaloides medial y cortical, cuerpos mamilares, cuerpo calloso, septo y mesencéfalo), el núcleo caudado de la estria terminal, área preoptica hipotalámica, núcleo supraquiasmático, la hipófisis (Vida y cols. 2008), también las células gliales presentan ambos REs (Mhyre y Dorsa 2006).

### **1.5.3. Efectos genómicos del receptor de estrógeno.**

La teoría clásica de acción de las hormonas esteroideas establece que como en el RE, éste es activado al unirse a su ligando, el  $17\beta$ -estradiol (E2), y actúa como un factor transcripcional al unirse al ADN estimulando la transcripción de ciertos genes, de ahí el nombre de receptores nucleares, ya que ejercen su acción a nivel del núcleo (Evans 1988, Beato y cols. 1995). Este modo de acción de los esteroides ha sido denominado genómico (Falkestein y cols. 2000), ya que requiere la activación del receptor al unirse a su hormona específica después de haber atravesado la membrana, la formación de la homo o heterodimerización (dos RE $\alpha$  o un RE $\alpha$  se heterodimeriza con un RE- $\beta$ ) del complejo hormona-receptor y el reconocimiento de una secuencia específica en el ADN o elemento de respuesta a estrógeno (ERE, Klein-Hitpass y cols. 1986). En consecuencia, el proceso de transcripción es activado al formarse el complejo de iniciación de la transcripción, que incluye diferentes coactivadores, correpresores y proteínas reguladoras de la transcripción. La transcripción estimulada por el RE es finamente regulada dependiendo del tejido donde ocurre, este control tan específico parece depender de la composición del complejo de iniciación de la transcripción (Lieberman 1997). Un grupo de factores transcripcionales basales interactúa con el complejo hormona-receptor para formar un complejo de preiniciación, al cual se le van a unir una serie de proteínas correguladoras llamadas: proteínas de interacción con receptores o RIPs (del inglés: Receptor Interacting Proteins); estos correguladores pueden activar o reprimir la transcripción. Este proceso, donde se induce la síntesis de ARN, que resulta en la producción final de nuevas proteínas, requiere usualmente de por lo menos 1-2 horas después de iniciado el tratamiento con la hormona (Lieberman 1997).

### **1.5.4. Efectos no genómico del receptor de estrógeno.**



El modo de acción no-genómico del estrógeno y en general de todas las hormonas esteroideas es un proceso rápido, que ocurre en unos pocos segundos o minutos y no requiere de los procesos de transcripción, ni de síntesis de nuevas proteínas, para poder producir su acción, por esta razón debe ser mediado por un receptor localizado en la membrana. Este proceso de respuesta fisiológica rápida, ante un esteroide fue descrito por primera vez en 1942, cuando el Dr. Hans Seyle observó en pacientes efectos anestésicos casi inmediatos después de la administración de progesterona. En 1967 Szego y Davis describieron por primera vez la idea de que el estrógeno podía inducir efectos rápidos, "no-genómicos", al demostrar el aumento en la producción de AMP cíclico (cAMP) in vivo, pocos segundos después del tratamiento con estradiol (Szego y Davis 1967). En 1977 Pietras y Szego demostraron la presencia de sitios específicos de unión a estrógeno en la superficie de células endometriales y posteriormente lograron purificar receptores de estrógeno de membranas celulares provenientes de hepatocitos (Pietras y Szego 1977, Pietras y Szego 1979). Entre estos efectos rápidos se encuentran flujos de iones, desencadenamiento de potenciales de acción, descarga de vesículas secretoras o activación de proteínas kinasas asociadas a la membrana, todos estos procesos ocurren en unos pocos segundos o minutos (Nemere y Farach-Carson 1998, Watson y Gametechu 1999, Falkenstein y cols. 2000).

### **1.5.5. Antiestrógenos**

Los antiestrógenos son compuestos que antagonizan la acción de los estrógenos compitiendo por su receptor. Los antiestrógenos se clasifican en tipo I o parciales (agonista/antagonista), y tipo II o puros (antagonista puro), los cuales tienen mecanismos de acción diferentes.

#### **1.5.5.1. Tipo I o moduladores selectivos del RE**

Estos compuestos son de naturaleza no-esteroidal, en su mayoría análogos del Tamoxifen y/o de sus metabolitos, siendo la forma 4-hidroxi-tamoxifen, el antiestrógeno más potente. Presentan propiedades agonistas y antagonistas y se denominan Moduladores Selectivos del Receptor de Estrógenos (MSRE), debido a que pueden actuar de manera diferente dependiendo del órgano blanco.

**Mecanismo de acción.** Todos estos fármacos comparten un mecanismo de acción común, su acción se inicia con la unión de estos compuestos al RE, lo cual permite la dimerización del

receptor, así como la unión del complejo hormona- receptor al ERE presente en algunos genes. El efecto antiestrogénico se lleva a cabo a través de la inhibición de la actividad del factor de transcripción TAF-2, pero no del TAF-1, el cual se mantiene activo (Katzenellenbogen y cols. 1977, Mcinerney y Katzenellenbogen 1996). Este mecanismo es, en principio, la razón de su actividad como agonista/antagonista; sin embargo, recientemente se describió un tercer sitio de activación llamado AF2a, el cual puede funcionar cuando AF1 y AF2 están inactivos. (Norris y cols. 1997) Además, hay evidencias que sugieren que los antiestrógenos se unen de manera diferente a los TAF, dependiendo de la concentración del fármaco, siendo TAF-2 el de mayor afinidad. Un ejemplo de ello, es el efecto antiestrogénico parcial del tamoxifen, cuya acción a bajas concentraciones se lleva a cabo a través del bloqueo de TAF-2, en tanto que a concentraciones altas inhibe totalmente la acción del RE, bloqueando tanto TAF-1 como TAF-2 (Hedden y cols. 1995).

La actividad diferencial que presentan los MSRE, podría deberse a los correguladores los cuales pueden determinar la dirección de la transcripción iniciada por el RE, ocupado por MSRE (Gee y cols. 1999), de los coactivadores que sólo se unen al RE cuando se encuentra unido a un agonista (Gee y cols. 1999) y de los correguladores selectivos que potencian el antagonismo de los antiestrógenos e inhiben la activación transcripcional inducida por estrógenos (Takimoto y cols. 1999). Algunas evidencias experimentales muestran que la acción del estradiol y los MSRE, varía dependiendo de si se unen a la forma  $\alpha$  o  $\beta$  del RE, y también del tipo de secuencia nucleotídica de los elementos de respuesta. Por ejemplo, Barkem demostró que los MSRE ejercen efectos agonistas sobre los ERE a través del RE $\alpha$ , pero no con la forma  $\beta$  (Barkem y cols. 1999), y que tanto estos moduladores como el estradiol (E2), actúan como activadores transcripcionales a través de los sitios AP-1, a través de la forma  $\alpha$ , pero no con la forma  $\beta$  (Peach y cols. 1997). A pesar de estos notables avances, es evidente que aún no se cuenta con un modelo que explique plenamente el mecanismo o mecanismos de acción de estos compuestos, pero es claro que los factores involucrados en la respuesta, tanto a E2 como a MSRE, son diversos y que este fenómeno es mucho más complejo de lo que se pensaba antes del descubrimiento de los RE $\beta$ .

#### **1.5.5.2. Tipo II o puros.**



Son compuestos de naturaleza esteroidea. Inhiben la acción de los estrógenos en todas las condiciones en las que han sido probados, y originalmente se utilizaron para el tratamiento de cáncer avanzado resistente a la terapia con tamoxifen.

**Mecanismo de acción.** Estos compuestos tienen una alta afinidad por el RE e inhiben la acción de los estrógenos por competencia por este receptor. Su acción antiestrogénica se efectúa al impedir la dimerización de este receptor (Fawell y cols. 1990), lo cual no le permite su unión al ERE, y por lo tanto iniciar la transcripción de los genes. Asimismo, se ha demostrado que estos compuestos pueden bloquear la translocación del RE al núcleo, lo cual incrementa su degradación citoplasmática. (Gibson y cols. 1991, Davois y cols. 1993) Este modelo de acción explica por qué estos agentes presentan siempre actividad antagonista y bloquean cualquier efecto estrogénico mediado por el RE.

#### **1.6. Control neuroquímico sobre la regulación de la conducta sexual femenina en roedores.**

Se ha mostrado que las hormonas esteroideas ejercen su efecto sobre la conducta sexual a través de: a) alterar la biosíntesis y liberación de neurotransmisores, b) provocar modulación alostérica de receptores membranales, c) inducir cambios en la densidad de receptores a neurotransmisores y d) por tener interacción con proteínas dependientes de guanosina trifosfato cíclico (GTP, proteínas G, Nock y Feder 1981).

A fin de explorar la participación del sistema de neurotransmisores en la regulación de la conducta de estro, se han utilizado básicamente dos estrategias experimentales: a) en roedores Ovx pretratados con estrógenos y P (para inducir valores máximos de receptividad sexual), se ha evaluado si la administración de fármacos que antagonizan la acción de algún neurotransmisor inhibe la conducta de estro; b) en roedores Ovx tratados con dosis bajas de estrógenos (insuficientes para inducir altos niveles de receptividad sexual), se ha evaluado si la administración de agonistas de algún neurotransmisor facilita la conducta de estro. Estas estrategias han revelado que diversas familias de agentes neuroactivos participan en la regulación del comportamiento sexual femenino (Beyer y González-Marsical 1986, Pfaff y cols. 1994, Pfaff y cols. 2006).

Existen evidencias que muestran que la conducta de lordosis puede ser inducida por una amplia variedad de agentes, tanto derivados de esteroideas, como de origen no esteroidea; estudios

realizados por diversos investigadores (Kow y cols. 1994a, Pfaff y cols. 1994), señalan la existencia de una gran variedad de agentes con diferentes estructuras químicas que inducen la conducta de lordosis como: 1) péptidos y proteínas como la GnRH (Moss y Foreman 1976), la oxitocina (Caldwell y cols. 1986) y la prolactina (Harlan y Pfaff 1983), 2) aminas biogénicas como la noradrenalina (NA; Fernández-Guasti y cols. 1985), 3) la acetilcolina (Dohanich y cols. 1984), 4) la PGE<sub>2</sub> (Hall y Luttge 1977, Ojeda y cols. 1977, Rodríguez-Sierra y Komisaruk 1982), 5) aminoácidos: el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA, Agmo y cols. 1989) y la glicina (Pfaff y cols. 1994), 6) progestinas como la 5 $\beta$ , 3 $\alpha$ -pregnanolona (Rodríguez-Manzo y cols. 1986), la 5 $\alpha$ -pregnandiona, la 5 $\beta$ , 3 $\beta$ -pregnanolona, la 5 $\alpha$ , 3 $\beta$ -pregnanolona y la 20 $\alpha$ -OH-progesterona (Beyer y cols. 1989, 1995), 7) nucleótidos cíclicos: AMPc (Beyer y cols. 1981) y GMPc (Fernández-Guasti y cols. 1983, Chu y cols. 1999). Sin embargo, existen algunos neurotransmisores que dependiendo del tipo de receptor que activen, será el efecto que ejerzan sobre la CSF, por ejemplo, cuando la serotonina actúa sobre su receptor 5HT<sub>2</sub> o la dopamina sobre su receptor D<sub>1</sub>, facilitan la conducta de estro en ratas OVX pretratadas con estradiol, no obstante cuando la serotonina y la dopamina actúan en otro tipo de receptores (5HT<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>, respectivamente) provocan clara inhibición de la conducta sexual (Kow y cols. 1994a).

### **1.6.1 Prostaglandina E<sub>2</sub>.**

En 1930, Kurzrok y Lieb observaron que el semen humano era capaz de inducir contracciones y relajaciones en el útero aislado. Posteriormente, Goldblat y von Euler descubrieron que dichas contracciones eran producidas por un ácido graso existente en la próstata de carneros, por lo que le dieron el nombre de prostaglandina. Su importancia biológica permaneció incierta durante varias décadas, hasta que en 1962 se aislaron en forma cristalina las prostaglandinas de la serie E y F (PGE<sub>2</sub> y PGF); sus nombres derivan del solvente utilizado para su aislamiento, las de la serie E al éter y las de la serie F a la solución buffer fosfato. En la década de los 70's Samuelsson y Hamberg descubrieron las series G y H, posteriormente el tromboxano (TXA<sub>2</sub>) y su metabolito (TXB<sub>2</sub>), que controlan la agregación plaquetaria. Así, para 1976 Moncada y su grupo descubrieron la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), que es una sustancia antiagregante de las plaquetas (Sumano y Ocampo 1988). Estos compuestos, también llamados eicosanoides, son derivados del metabolismo del ácido araquidónico y son clasificados en series categóricas (de la A a la F)



con base en sus diferencias estructurales. Las clases más comunes son las prostaglandinas E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> y F<sub>2α</sub>. Las primeras dos letras se refieren al grupo particular del cual proviene el compuesto (PG = prostaglandinas; TX = tromboxanos), la tercera letra denota la serie a la que corresponde (A-F), ya que cada serie particular tiene un anillo idéntico, incluyendo sustituciones y dobles enlaces. Finalmente, el número indica la cantidad de dobles enlaces que existen en la molécula (Wolfe y Horrocks 1994).

Los efectos fisiológicos de las prostaglandinas son tan variados como los sitios donde se sintetizan, sobre procesos reproductivos la prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) causa luteólisis en muchas especies (vaca, cerda, perra, etc., Sumano y Ocampo 1988), se ha sugerido que el mecanismo por el cual la PGF<sub>2α</sub> provoca la regresión lútea se debe a que disminuye la irrigación del cuerpo lúteo. Además de la PGF<sub>2α</sub>, otra prostaglandina importante es la PGE<sub>2</sub>, un ácido graso derivado del ácido araquidónico, por acción de la enzima ciclo oxigenasa. Este compuesto induce la motilidad del útero humano y se ha mostrado que sus efectos son muy superiores a los de las prostaglandinas de la serie F (Sumano y Ocampo 1988). La PGE<sub>2</sub> también produce vasodilatación, broncodilatación, aumento de la motilidad y secreción gastrointestinal y participa en la lipólisis. También es responsable de la contracción del músculo liso de las vesículas seminales, de modo que contribuye en la contracción de los conductos genitales durante la eyaculación (Wolfe y Horrocks 1994).

Estudios realizados para explorar el efecto de la PGE<sub>2</sub> sobre la conducta sexual femenina, mostraron que la administración por vía sistémica o intracerebral facilita la expresión de dicha conducta en ratas OVX pretratadas con estrógenos (Dudley y Moss 1976). Además, en otro estudio la administración de PGE<sub>2</sub> en el hipotálamo indujo la liberación de GnRH (Eskay y cols. 1975) e incrementó considerablemente la concentración de LH (Ojeda y cols. 1977). Por ésta razón, se propuso que la PGE<sub>2</sub> facilita la CSF a través de la liberación de GnRH, ya que se sabe que éste péptido activa la conducta de lordosis en ratas Ovx pretratadas con benzoato de estradiol (Moss y Foreman 1976). Así, Hall y Luttge (1977) realizaron trabajos para comprobar si la PGE<sub>2</sub> inducía la conducta de estro a través de la liberación de GnRH, para ello administraron intrahipotalámicamente PGE<sub>2</sub> en cristales a ratas Ovx previamente estrogenizadas. Encontraron que inducía altos niveles de receptividad y propusieron que esta respuesta sobre la conducta sexual, podría ser a través de promover la secreción de Gn RH. Posteriormente, los mismos

investigadores (Hall y Luttge 1978) administraron por vía subcutánea o icv, indometacina (7.5 mg; un bloqueador de la síntesis de prostaglandinas), la cual no bloqueó la receptividad inducida por estrógeno o por estrógeno más P. Sin embargo, cuando administraron 15 mg de indometacina si se bloqueó la receptividad sexual, pero también se inhibió la actividad locomotora de los animales en un campo abierto, e incluso causó la muerte de algunos animales. Con base en sus resultados, los investigadores concluyeron que la síntesis de prostaglandinas no es un paso requerido para que el estrógeno y la P ejerzan sus efectos sobre la conducta y que la activación de la conducta sexual inducida por PGE<sub>2</sub> es a través de un mecanismo diferente que podría incluir la liberación de la GnRH. Estos resultados son apoyados por una serie de experimentos realizados por Brown y Poyser (1984), en los que midieron el efecto de flurbiprofen (2 mg/kg, un inhibidor de la actividad de la ciclo oxigenasa), sobre la síntesis de PGE<sub>2</sub>. Encontraron que este compuesto no sólo reduce la síntesis de prostaglandina, sino que también bloquea la producción de LH. Por su parte Rodríguez-Sierra y Komisaruk (1978), encontraron que la PGE<sub>2</sub> al ser administrada a ratas Ovx histerectomizadas (remoción del útero) y aún sin pretratamiento con estrógenos, induce respuesta de lordosis por estimulación vaginal y estimulación manual de los flancos, aunque menos intensa que la observada en el estro normal o en ratas pretratadas con estrógeno. Por otro lado, se ha encontrado que la prostaglandina E2 administrada por vía sistémica o en el hipotálamo ventromedial, alcanza valores máximos en el hipotálamo poco antes de la ovulación, además de estimular la receptividad sexual en ratas OVX estrogenizadas, efecto inducido a través de la activación del RP (Beyer y González-Mariscal 1986, Beyer y cols. 2003, Blaustein 2003, Etgen 2003, Pfaff y cols. 2006).

#### **1.6.2. GnRH.**

Diversas hormonas peptídicas (producidas en el hipotálamo) son capaces de activar la conducta de estro en roedores; por ejemplo, la hormona liberadora de gonadotropinas, induce receptividad sexual al administrarse por vía sistémica o intracerebral a ratas Ovx, pretratadas con estrógenos (Pfaff y cols. 2006). Esta participa en el proceso de ovulación y posiblemente en la inducción de la conducta sexual de la rata (Pfaff 1973, Moss y Mc Cann 1975, Moss y Foreman 1976, Sakuma y Pfaff 1979, Rodríguez -Sierra y Komisaruk 1982). La producción GnRH se mantiene en un nivel basal desde el estro hasta la tarde del proestro. En el proestro los niveles aumentan brevemente. El hecho de que el pico de GnRH ocurra en la tarde del proestro, coincidiendo con



la expresión de la conducta de lordosis, sugiere que este péptido participa en la expresión de la conducta de estro (Moss y McCann 1973, Pfaff 1973). Esta idea se ve apoyada por la observación de que la administración de GnRH por varias rutas, facilita la conducta de estro en ratas ovx pretratadas con E2, independientemente de su efecto sobre la liberación de gonadotropinas o corticoides suprarrenales (Waring y Turgeon 1983). Se ha observado que este péptido facilitan la respuesta de lordosis cuando se administra directamente en el tercer ventrículo (Dudley y cols. 1983), en el APOm (Rodríguez-Sierra y Komisaruk 1982), el HVM (Foreman 1976, Moss y Foreman 1976, Chan y cols. 1983), o en la sustancia gris mesencefálica (Riskind y Moss 1979, Sakuma y Pfaff 1979) de ratas previamente estrogenizadas. La aplicación de un anticuerpo específico para la GnRH en la sustancia gris mesencefálica, bloqueó la conducta de lordosis que normalmente se presenta durante el proestro (Sakuma y Pfaff 1983). No se sabe si la GnRH activa directamente a neuronas de las áreas involucradas en la expresión de la conducta sexual, como el HVM y el APOm, o si modula la transmisión aferente a estas células (Chan y cols. 1983). Existen datos que indican que la GnRH, actúa modulando la transmisión noradrenérgica o produciendo la liberación de NA; ya que el efecto facilitador de GnRH sobre la lordosis en ratas pretratadas con estrógeno fue bloqueado por la administración de antagonistas alfa y beta adrenérgicos (González-Mariscal y Beyer 1989). Además, de que la GnRH estimula la secreción de gonadotropinas, interactuando con receptores membranales acoplados al sistema de adenilato ciclasa (Fraser 1979). Por lo tanto, es posible que la GnRH facilite la expresión de la lordosis aumentando los niveles de AMPc en neuronas relacionadas con esta conducta (Moss y McCann 1975). En apoyo a esta idea Beyer y cols. (1982b), mostraron que los inhibidores de fosfodiesterasas (enzima responsable de la inactivación del AMPc), teofilina y metilsobutil xantina (MIX) facilita la acción de GnRH sobre la conducta de lordosis. Estos datos apoyan la idea de que esta hormona, induce conducta sexual a través de incrementar los niveles de AMPc, en las neuronas relacionadas con la expresión de la conducta sexual femenina. Por otra parte, la GnRH también provoca la hidrólisis del fosfatidil inositol (PI) y la activación de la cinasa C en la hipófisis y en algunos órganos reproductivos (Leung y Wang 1989). La GnRH o alguno de sus agonistas, promueven la movilización de iones de calcio además de aumentar su concentración (Conn y cols. 1981b). La cinasa dependiente de calcio calmodulina (Conn y cols. 1981 a) y la proteína cinasa C (Harris y cols. 1985) aparentemente



tienen un importante papel como mediadores de la acción de GnRH, en la liberación de gonadotropinas (Conn y cols. 1981a). Recientemente se ha sugerido que este efecto inductor de la conducta sexual femenina por este péptido pudiera ser debido a sus metabolitos (Wu y cols. 2006).

### **1.6.3. Estimulación vaginocervical.**

Como resultado de la intromisión peneana por parte del macho, se presenta la EVC que es un componente importante de la estimulación recibida por la rata hembra durante la cópula, provocando procesos sensitivo hormonales, entre los que se incluyen la liberación de LH (hormona luteinizante, Moss y cols. 1977) y de prolactina que pueden dar como resultado la pseudogestación (Gunnert y Freeman 1983). A corto plazo, prolonga la respuesta de lordosis (Diakow 1975), a largo plazo, reduce la respuesta de lordosis pero incrementa el rechazo (Hardy y DeBold 1972, Pfau y cols. 2000), por lo que causa un decremento en del periodo de receptividad sexual (Blandau y cols. 1941, Reading y Blaustein 1984, Pfau y cols. 2000) especialmente cuando la estimulación durante la copula es dirigida por la hembra (Erskine y cols. 1989). Los resultados de muchos experimentos sugieren que el proporcionar experimentalmente EVC a ratas, en algunos casos puede simular el efecto de la intromisión por una rata macho en la fisiología y conducta reproductiva (Komisaruk y Larsson 1971). Las sondas experimentales que son usadas para este fin, son típicamente de cristal o plástico liso, y estas proporcionan presión directamente al cérvix con solamente una leve presión y distensión de la pared vaginal (y en algunos casos, ha sido usada la estimulación eléctrica del cérvix (Gorospe y Freeman 1981)). En contraste, el pene de la rata está cubierto con espinas queratinosas, que probablemente causa una estimulación mucho más intensa de la pared vaginal que la sonda lisa (Taylor y cols. 1983, Sachs y cols. 1984). Además, actualmente se desconoce si el pene tiene contacto directamente con el cérvix durante una intromisión; por lo que es probable que la estimulación del cérvix podría deberse a la eyaculación o por la formación del tapón seminal. Aunque se desconoce si la EVC artificial, proporciona el mismo elemento crucial de estimulación genitosensorial proporcionada por una intromisión, la EVC artificial causa estrechamiento longitudinal de la pared vaginal, que causa suficiente estimulación vaginal para inducir una inmovilización similar a la inducida por una intromisión (Komisaruk y Larsson

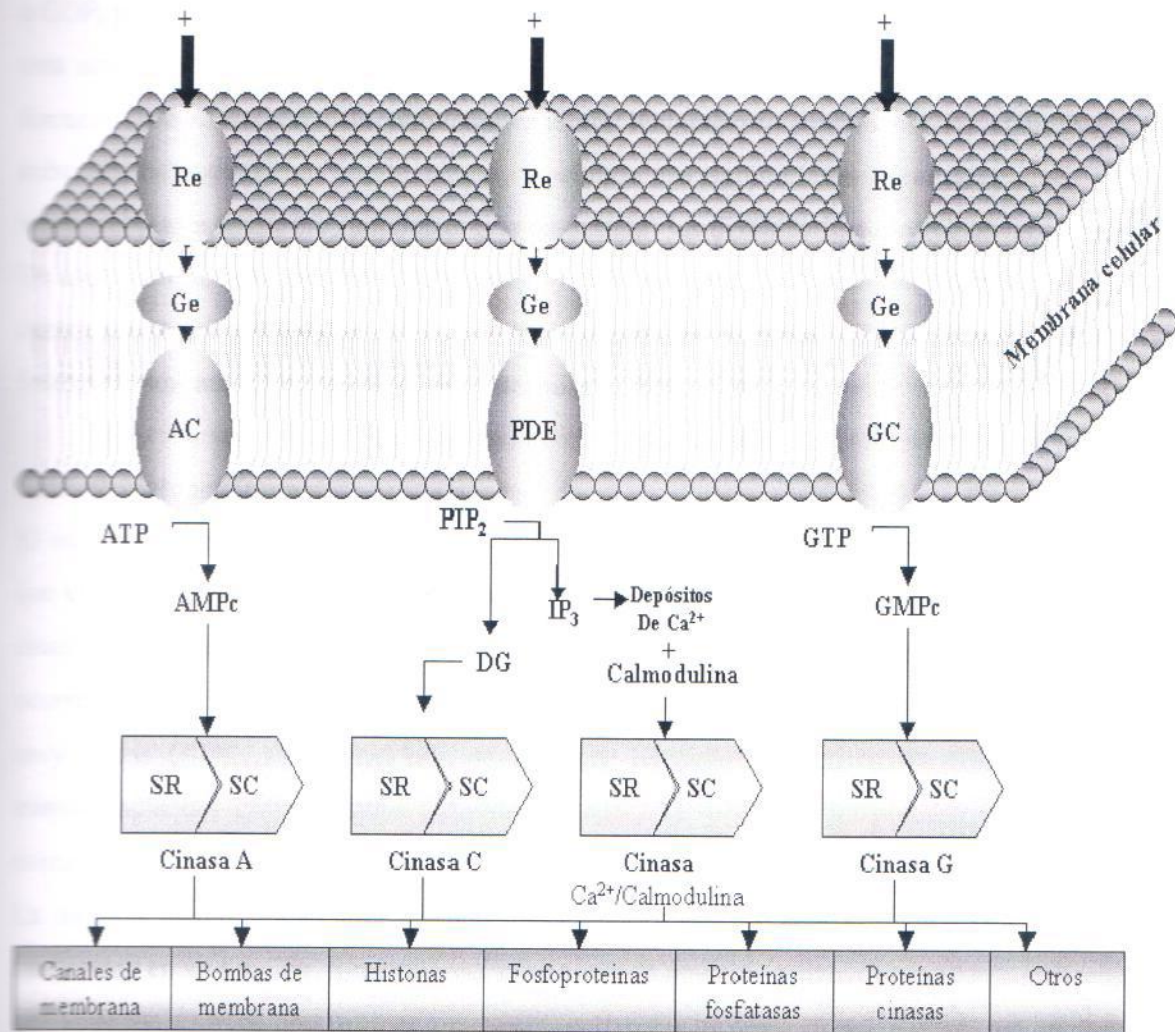
1971). Por lo tanto, la EVC artificial puede inducir los mismos cambios fisiológicos que los de una intromisión. Sabemos que el nervio pélvico es mediador del acortamiento del estro en la rata inducido por la cópula, porque la neurectomía pélvica bloquea el efecto de acortamiento del estro por intromisiones (Lodder y Zeilmaker 1976). En contraste, en cobayo, la transección del nervio pélvico, pudendo y genitofemoral (Sлимп 1977) no tiene efecto. Se ha argumentado, que hay una ruta no neural de transmisión para la información desde los genitales hacia el cerebro en el cobayo. Sin embargo, como el nervio vago también transmite información sensorial desde el cérvix y vagina hacia el cerebro (Cueva-Rolon y cols. 1996, Komisaruk y cols. 1996), esta ruta neural tiene que ser considerada antes de descartar una conexión neural.

Recientemente nosotros estudiamos la participación del sistema noradrenérgico sobre la conducta de estro inducida por la estimulación vagino cervical. Encontramos que los receptores  $\alpha 1$  adrenérgicos, están involucrados en la regulación de la conducta de estro durante dicha estimulación cervical (González-Flores y cols. 2006).

### 1.7. Fosforilación de proteínas.

A través de la fosforilación de proteínas diversas hormonas regulan eventos intracelulares (Girault, 1993). A partir de los estudios iniciados con la fosforilasa del glicógeno, se puso de manifiesto la importancia de este evento celular, que es mediado por segundos mensajeros. Así, muchas señales extracelulares (primer mensajero) incluyendo hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores, potencial eléctrico y componentes de la matriz extracelular, alteran el estado de fosforilación de proteínas intracelulares (Nestler y Greengard, 1994). Esto se lleva a cabo a través de una cascada de eventos que se ilustran en la Fig.7, con la vía adenilato ciclasa  $\rightarrow$  AMPc  $\rightarrow$  proteína cinasa A.





**Figura 7.** Mecanismo de fosforilación de proteínas. Fosforilación de proteínas, producida por diferentes cascadas de segundos mensajeros y sus respectivas cinasas. Explicación y abreviaturas en el texto (modificado de Berridge, 1985).

El mecanismo consiste en los siguientes pasos: la señal extracelular (primer mensajero) se une a un receptor membranal (R), que se encuentra acoplado a una proteína G (transductora) que es activada por medio del GTP. La proteína G activada estimula a una proteína amplificadora, la adenilato ciclasa (AC), hasta que el GTP que se encuentra unido a la proteína G es defosforilado



aGDP, provocando con ello un efecto de cierre sobre la actividad de la ciclasa. La AC, mientras esta activada, cataliza la síntesis de AMPc al remover dos iones fosfato del ATP. El recién formado AMPc activa a un regulador interno, llamado proteína cinasa A, al unirse a las subunidades reguladoras de la cinasa, liberando las subunidades catalíticas, que son las responsables de fosforilar (adicionar grupos fosfato) las distintas fosfoproteínas intracelulares. De esta manera, el incremento en la concentración de AMPc inducido por el primer mensajero desencadena las respuestas celulares, cuya naturaleza depende de las propiedades de las fosfoproteínas activadas por la cinasa (Berridge, 1985).

### **1.7.1. Proteínas cinasas**

El número de proteínas cinasas descritas en la actualidad asciende a más de cien y se calcula que el genoma de los mamíferos puede codificar a más de mil de estas enzimas. Las proteínas cinasas son clasificadas de acuerdo al sustrato que fosforilan, muchas fosforilaciones (>95%) ocurren sobre residuos de serina, una pequeña cantidad (~3-4%) sobre residuos de treonina y muy pocas (<1%) sobre residuos de tirosina. En todos los casos, la cinasa cataliza la transferencia del grupo fosfato terminal ( $\gamma$ ) del ATP o GTP a la porción hidroxilo en el correspondiente aminoácido (Nestler y Greengard, 1994).

La adición de un grupo fosfato a una proteína, induce un cambio en su conformación y finalmente en su función. Sin embargo, para que esta reacción pueda desarrollarse es necesario que una señal extracelular (primer mensajero) active a la proteína cinasa, a través del incremento intracelular de segundos mensajeros, tales como AMPc, GMPc, Calcio (Ca) y DG (Nestler y Duman 1994; Nestler y Greengard, 1994).

Entre las proteínas cinasas más importantes del SNC se encuentran aquellas activadas por AMPc, GMPc, Ca y DG, llamadas proteína cinasa A (PKA), proteína cinasa G (PKG) y proteína cinasa C (PKC), respectivamente (Nestler y Greengard, 1994). Cada proteína cinasa, aunque con funciones semejantes, muestra en su estructura características particulares; por ejemplo, la PKA es un tetrámero de dos subunidades reguladoras y dos subunidades catalíticas, mientras que las proteínas cinasas G y C son dímeros, constituidas por sólo una subunidad reguladora y una catalítica (Nestler y Greengard, 1994).

Se han realizado diversos trabajos para estudiar como es que se regula la actividad de las cinasas, para ello, se han administrado activadores de dichas enzimas, principalmente análogos de nucleótidos cíclicos o del DG (ésteres de forbol; Girault, 1993) o administrando inhibidores de su actividad, tal es el caso del isoquinolinesulfonamida (H8), que inhibe la actividad de las PKA, PKG y PKC, o el isoquinolinesulfonil (H7), que inhibe la actividad de las PKC y PKA (Hidaka y col., 1991; Tokuyama y col., 1995). Se ha propuesto que el H7 compite con el segundo mensajero y bloquea la actividad de las cinasas al evitar la disociación de sus subunidades (Hidaka y Kobayashi, 1992).

### **1.7.2. Proteínas fosfatasas**

Las proteínas fosfatasas son reguladoras de la actividad celular al defosforilar (quitar fosfatos) los residuos de serina, treonina o tirosina. Aunque menos estudiadas que las cinasas, también juegan un papel muy importante en la regulación de la actividad celular. Este grupo de proteínas es subdividido en cuatro grupos: 1) proteína fosfatasa-1, 2) proteína fosfatasa-2A, 3) proteína fosfatasa-2B y 4) proteína fosfatasa-2C (Walaas y Greengard, 1991).

Las proteínas fosfatasas pueden ser activadas directamente por un segundo mensajero o una proteína cinasa y su regulación depende de cuatro tipos de inhibidores: 1) los inhibidores 1 y 2, así como el DARPP-32 (fosfoproteína regulada por dopamina y AMPc), que inhiben a la fosfatasa 1, 2) el sustrato G, que inhibe a la fosfatasa 2A, 3) el inhibidor Ca/calmodulina, que inhibe a la fosfatasa 2B y 4) el inhibidor  $Mg^{2+}$ , que inhibe a la fosfatasa 2C.

### **1.7.3. Fosfoproteínas**

Las fosfoproteínas son aquellas proteínas que pueden cambiar su conformación por acción de las proteínas cinasas (fosforilación) o fosfatasas (defosforilación). Estas reacciones inducen cambios en las propiedades de la proteína para convertirse en un sustrato de otra proteína cinasa o fosfatasa, o participar en la activación de diversas respuestas fisiológicas (Walaas y Greengard, 1991), ya que las fosfoproteínas pueden ser enzimas involucradas en la biosíntesis de neurotransmisores, proteínas que regulan los niveles celulares de segundos mensajeros, inhibidores de proteínas fosfatasas, canales iónicos, receptores de neurotransmisores (Nestler y



Greengard, 1994) o receptores a esteroides como el receptor a progesterona (Kato y Onouchi, 1977).

## **1.8. La cinasa Src.**

### **1.8.1. Historia del descubrimiento de la Src.**

En 1909 Peyton Rous, que trabajaba en el Instituto Rockefeller de Nueva York, recibió una gallina Plymouth Rock la cual presentaba un tumor grande, al examen microscópico parecía ser un sarcoma de células fusiformes. El tumor resultó ser trasplantable a los pollos de la misma raza (Rous 1910), y en los pasajes posteriores a pollos de otras razas, desde ese momento se le denominó al tumor como sarcoma de Rous. Sorprendentemente, filtrados libres de células también podrían transmitir la enfermedad, lo que indicaba que el tumor era debido a un "agente filtrable" (Rous 1911). Otros tumores de pollo con distintas patologías, tales como un osteocondrosarcoma en cartílago y hueso, también resultaron contener agentes filtrables. Peyton Rous fue capaz de mostrar que habían distintos agentes, cada uno de los cuales producían tumores del mismo tipo que el tumor de que había sido derivado (Rous y Murphy 1914). En retrospectiva, esta especificidad de cepa, fue el primer indicio, de que la capacidad de inducir tumores era una propiedad genética del virus, aunque, por supuesto, la idea de que los virus podrían contener información genética sólo surgió algunos 30 ó 40 años más tarde. Cabe mencionar que incluso antes del descubrimiento de Rous, Ellerman y Bang (1908) en Copenhague, habían transmitido la leucemia eritromieloblástica con filtrados libres de células. Fujinami y Inamoto, (1914), en un trabajo independientemente al de Rous, en la Universidad Imperial de Kyoto, Japón, aislaron en otro pollo un sarcoma trasplantable. Sin embargo, los descubrimientos de estos tres grupos fueron recibidos con reacciones de indiferencia, hasta el escepticismo y la hostilidad. De hecho, un comentario relatado por el propio Rous, menciona que un oncólogo británico le dijo "Pero, mi querido amigo, esto no puede ser el cáncer, porque se conoce su causa". De tal forma que, durante muchos años, se ignoraron estos descubrimientos. Afortunadamente, Rous vivió lo suficiente para ver sus ideas reivindicadas, y en 1966, a la edad de 85 años, recibió el Premio Nobel de Fisiología o Medicina (Andrews 1971).



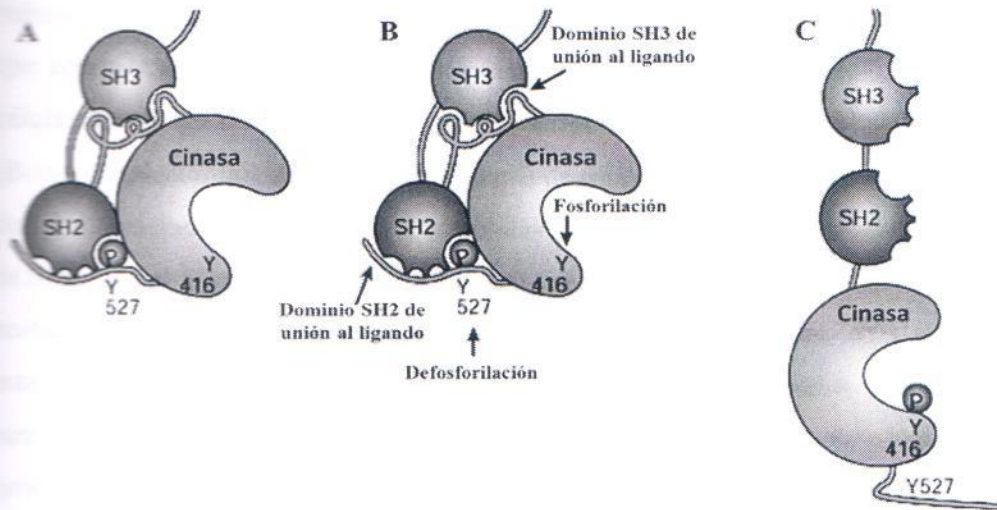
### 1.8.2. Estructura y Activación de la Src.

La proteína Src adquirió importancia debido a los trabajos sobre el virus del Sarcoma de Rous, encontrado en un tumor viral en el pollo por Peyton Rous en 1911 (Martin 2001). La proteína viral v-Src es codificada por el oncogen c-Src del virus del Sarcoma de Rous, causante de una forma de cáncer aviar; sin embargo, existe un homólogo de la v-Src en humanos y otras especies animales, la Src, la cual es codificada por un gen fisiológico (Roskoski 2004). Esta última es una tirosina cinasa de 60 kD (Brugge y Erikson 1977, Hunter y Sefton 1980), que a su vez es fosforilada sobre residuos de tirosina y está relacionada con la regulación del crecimiento y diferenciación celular (Ushiro y Cohen 1980). La estructura de la enzima muestra dos dominios en la porción amino terminal, que median la interacción de la enzima con otras proteínas, conocidos como SH2 y SH3; mientras que en la porción carboxilo de la proteína se localiza el dominio catalítico y un dominio regulador. Roussel y cols. (1991) propusieron que el dominio SH2 interactúa con tirosinas fosforiladas, lo que podría conducir a una interacción intramolecular entre el dominio SH2 y la tirosina fosforilada 527 del carboxilo terminal y en consecuencia producir un estado inactivo de la cinasa. Posteriormente, Sicheri y cols. (1997) y Xu y cols. (1997) determinaron que el dominio SH2 interactúa con la tirosina 527 fosforilada, mientras que el dominio SH3 interactúa con una secuencia rica en prolinas de la hélice II de la molécula, localizada entre el dominio SH2 y el dominio de cinasa, lo que mantiene a la molécula en un estado inactivo.

Así, la activación de la cinasa Src requiere de la autofosforilación de la enzima en la Tyr 416 (Ushiro y Cohen 1980, Smart y cols. 1981) y la defosforilación de la Tyr 527, ya que la fosforilación de la Tyr527 resulta en la inactividad de la cinasa (Fig. 8, Kmiecik y Shalloway 1987, Piwnica-Worms y cols. 1987). La activación de la cinasa Src puede ocurrir por diversos estímulos que activan receptores de tirosina cinasa o receptores acoplados a proteínas G, como los  $\beta$ -adrenérgicos (Luttrell y cols. 1999), receptores de citocinas (Wong y cols. 1999) y por receptores de esteroides como el receptor membranal de la progesterona (Maller 2001).

Una vez activada la cinasa Src fosforila sustratos localizados en el citoplasma o en las cercanías de la membrana celular, cuyo resultado final es un cambio en la conformación y en la función de los sustratos fosforilados, lo que provoca una cascada de señalización; de las cuales se han

reconocido ampliamente la vía de la PI3K, la vía Ras-MAPK y la de Stat3 (Brown y Cooper 1996, Abram y Courtneidge 2000).



**Figura 8. Estructura y activación de la cinasa Src.** En el panel A se muestra la conformación inactiva de la Src, en la cual Tyr527 interactúa con el dominio SH2, el dominio SH3 interactúa con una secuencia rica en prolinas localizada entre el dominio SH2 y el dominio catalítico. En B se muestran los dominios que sufren cambios para la activación de la cinasa y en C se muestra la conformación abierta o activa de la cinasa. (Tomado de Martin 2001).

Una vez activada la cinasa Src fosforila sustratos localizados en el citoplasma o en las cercanías de la membrana celular, cuyo resultado final es un cambio en la conformación y en la función de los sustratos fosforilados, lo que provoca una cascada de señalización; de las cuales se han reconocido ampliamente la vía de la PI3K, la vía Ras-MAPK y la de Stat3 (Brown y Cooper 1996, Abram y Courtneidge 2000).

### 1.8.3. Funciones de la cinasa Src.

La cinasa Src es un proto-oncogen que es modulada por el receptor del factor de crecimiento, integrina y el receptor de esteroides. Se han identificado diferentes sustratos para la cinasa Src en los que se incluyen las proteínas de adhesión focal, adaptador de proteínas y factores de transcripción. A través de estos mecanismos la cinasa Src regula la proliferación celular, la adhesión, invasión y motilidad. En muchos tipos de cáncer se incrementa la actividad de cinasa



Src, ya que cuando es activada por mutaciones o estimulada por factores de crecimiento, aumenta la proliferación celular, invasión y la motilidad (Yeatman 2004). Además, las hormonas esteroideas sexuales inducen la proliferación celular a través de la vía Src / Ras / ERK (Castoria y cols. 1999, Miglaccio y cols. 2000). Así, el estradiol induce la asociación de la subunidad reguladora p85 $\alpha$  de la fosfatidil 3 cinasa (PI3K) con el RE en las células endoteliales que conducen a la relajación vascular (Simoncini y cols. 2000) e induce la proliferación de células de cáncer de mama (Castoria y cols. 2001). El RP también interactúa con Src-SH3 (Boonyaratanakornkit y cols. 2001); el papel de esta interacción podría ser dependiente del tipo de célula, ya que en células T47D, en células U873, y en células Cos transfectadas la activación de Src unida al RP está mediada por ER (Miglaccio y cols. 2005, Vallejo y cols. 2005). En este sentido, cabe señalar que la forma B de PR (PRB) interactúa directamente con ER $\alpha$  y se requiere esta asociación para la activación de la MAP cinasa en células Cos (Ballare y cols. 2003). Por otra parte las progestinas inducen activación de la vía Src /Ras/Erk y la proliferación en células cancerosas mamarias (Miglaccio y cols. 1998). Recientemente, se ha informado que la rápida activación de Erk por progestinas participa en la activación de genes a través de la fosforilación de la cromatina (Vicent y cols. 2006). Este es un ejemplo entre la acción no-transcripcional y la transcripción de una hormona esteroide; otro ejemplo se ha observado en fibroblastos NIH3T3 los cuales expresan cantidades bajas de receptor de andrógenos (AR), que reside permanentemente fuera de los núcleos y, debido a su baja expresión, no activan la actividad transcripcional. La adición de concentraciones picomolares de andrógenos al medio, desencadena asociación AR con Src y la subunidad p85 de la PI3K, e induce la síntesis de ADN. Las mismas células responden a concentraciones nanomolares con modificaciones de la arquitectura citoesquelética (Castoria y cols. 2003).

También células del estroma uterino de la rata U873 que expresan bajos niveles de receptor de progesterona (PR) y ER $\beta$ , responden a la concentración picomolar de progestinas con proliferación activa (Vallejo y cols. 2005). En las plaquetas el estradiol induce la potenciación de la agregación inducida por trombina a través de ER $\beta$  y Src quinasa (Moro y cols. 2005).

### **1.9. Comunicación cruzada en la activación de la conducta de estro.**



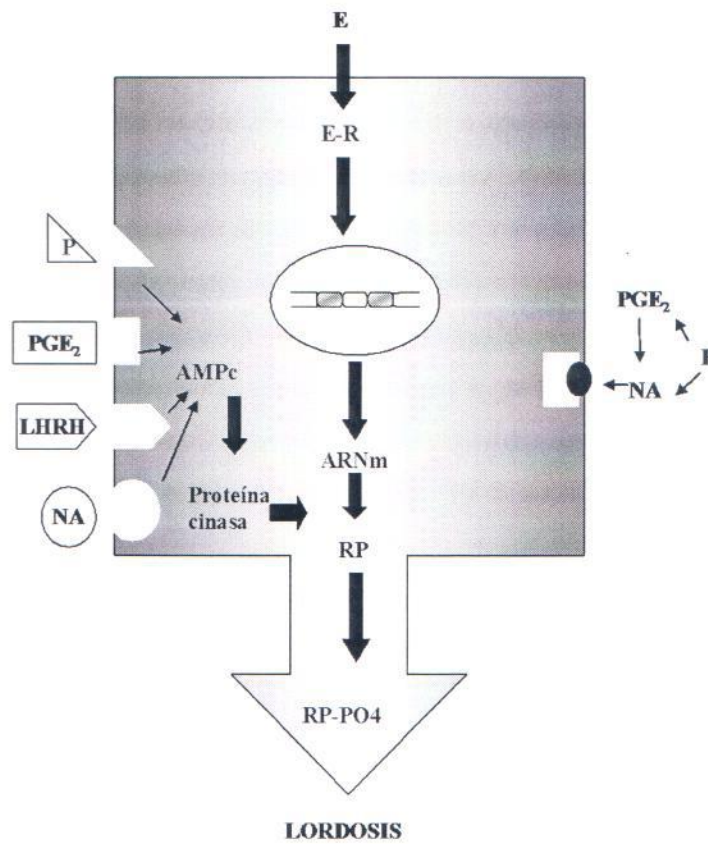
La comunicación cruzada entre señales intracelulares generadas por diferentes agentes (esteroides o neurotrofinas), es un medio económico por el cual la célula puede expandir y modular su repertorio de respuestas. La comunicación cruzada entre una hormona peptídica, de acción ejercida en la superficie de la membrana celular y una hormona esteroide que actúa en la matriz intracelular, ha sido recientemente documentada (Aronica y Katzenellenbogen, 1991; Cenni y Picard, 1999).

El modelo propuesto por Beyer y González-Mariscal (Fig. 9), fue el primer modelo *in vivo* que explicó la comunicación cruzada de los diferentes mecanismos de acción hormonal. Otros estudios sobre este tema han sido publicados, por ejemplo, compuestos como la dopamina, que actúa sobre la membrana celular y provoca la fosforilación de proteínas a través del sistema adenilato ciclasa, facilita la conducta sexual al administrarse intracerebroventricularmente en ratas Ovx pretratadas con estrógenos. Este efecto fue bloqueado por la administración de las antiprogestinas ZK 98299 y el RU 486 (Mani y col., 1994a; Apostolakis y col., 1996); el RU 486, también bloqueó la lordosis inducida por las progestinas  $5\alpha$ -pregnandiona y  $5\beta$ - $3\beta$ -pregnanolona (González-Mariscal y col., 1989; Beyer y col., 1995), así como la inducida por los agentes no esteroideos GnRH,  $PGE_2$  y AMPc (Adenosina monofosfato cíclico, Beyer y col., 1997).

Un ejemplo más de comunicación cruzada de señales entre agentes esteroideos y no esteroideos, fue el proceso llamado autopotenciación de la GnRH, que consiste en que la secreción de LH provocada por un segundo pulso de GnRH, es mayor que la inducida por el primer pulso (Waring y Turgeon, 1983). Las pruebas que apoyan la participación de la comunicación cruzada en éste proceso son: 1) el efecto de la GnRH es dependiente de ARNm y la síntesis de proteínas (Turgeon y Waring, 1994), 2) se requiere de un pretratamiento con estradiol (Cover y Buckinham, 1989), 3) la administración de P, AMPc o forskolin (activador de la AC) en células cultivadas de la pituitaria anterior de la rata, sustituyeron al primer pulso de GnRH e indujeron potenciación. Con base en estos resultados Waring y Turgeon (1992), propusieron que el RP podría ser el mediador molecular común en la potenciación de GnRH, por los diversos agentes, ya que la P, AMPc y forskolin inducen la fosforilación del RP, mientras que la GnRH activa a la AC y PKC; además, el RU 486 antagonizó efectivamente la potenciación de ésta hormona. Por otra parte, Cenni y Picard (1999), en sus estudios sobre el

cáncer, reportaron que la activación de diversos receptores a esteroides se puede llevar a cabo *aún* en ausencia de su ligando natural, por diversos agentes, como factores de crecimiento, neurotransmisores o agentes que activan a la PKA.

Estas evidencias han permitido proponer que el mediador común para la activación de la conducta de lordosis es el RP, ya que integra la multitud de señales que provienen de la matriz extracelular (Beyer y col., 1995,1997; González- Mariscal y col., 1989), al ser fosforilado por diversas cinasas (Beyer y González-Mariscal, 1986).



**Figura 9.** Modelo de comunicación cruzada entre los mecanismos membranal y genómico. La figura muestra la propuesta del Dr Beyer para explicar la activación de la conducta de lordosis

inducida por agentes que actúan sobre la membrana celular. Se muestra la activación de cascadas de segundos mensajeros para la activación del receptor a progesterona intracelular (Beyer y cols., 1981). P=progesterona; PGE<sub>2</sub>= prostaglandina E<sub>2</sub>; LHRH= hormona liberadora de la hormona luteinizante; NA= noradrenalina; AMPc= adenosina monofosfato cíclico; E= estrógeno, E-R= receptor a estrógeno; ARNm= ácido desoxirribonucleico mensajero; RP= receptor a progesterona; RP-PO<sub>4</sub>= Receptor a progesterona fosforilado.



## 2. ANTECEDENTES

Se sabe que la progesterona (P) actúa sobre las neuronas del hipotálamo ventromedial (HVM) para facilitar el comportamiento de estro (lordosis y proceptividad) en ratas, a través de unirse a el receptor de progesterona (RP) (Barfield y cols. 1984, Etgen 1984, Mani y cols. 1997). Sin embargo, la P es rápidamente metabolizada en el cerebro en una variedad de progestinas reducidas en el anillo A, las cuales tienen poca afinidad por el RP (Cheng y Karavolas 1973, Karavolas y cols. 1984, Celotti y cols. 1992). Pero estas progestinas cuando son administradas dentro del cerebro o en los ventrículos cerebrales, son más potentes que la P en inducir el comportamiento sexual en ratas hembras previamente estrogenizadas (Beyer y cols. 1989, 1995, González-Flores y cols. 2006). El mecanismo a través del cual estas progestinas reducidas en el anillo A facilitan el comportamiento de estro no es claro. Datos recientes, sugieren que otros mecanismos celulares diferentes a la unión con el RP, participan en la facilitación del comportamiento sexual ocasionado por estos compuestos. Tanto la P, como las progestinas reducidas en el anillo A y otros agentes no esteroideos (e.g. GnRH, PGE2, dopamina, NA etc.) o la estimulación vaginocervical (EVC), pueden activar diversas proteínas cinasas, como son la proteína cinasa A (Mani y cols. 2000, González-Flores y cols. 2006), la proteína cinasa G (Whalen y Lauber 1986, Chu y cols. 1999) y la MAPK (Etgen y Acosta-Martinez 2003, González-Flores y Etgen 2004, González-Flores y cols. 2004, 2008, Frye y Walf 2008). Todas estas, han sido implicadas en la expresión de la conducta de estro en ratas. Los datos antes mencionados, sugieren que estos agentes actúan sobre diferentes vías de señalización a nivel del RP o en asociación con otras proteínas (coactivadores, correpresores, etc.). Recientemente, se ha propuesto la existencia de una comunicación cruzada entre el mecanismo membranal y genómico, que involucraría al RP como la proteína molecular común de este evento. Así, la P, GnRH, NA, PGE2, cAMP, and cGMP deben estar presentes en el hipotálamo (área cerebral involucrada en la activación de la lordosis) alrededor de la ovulación, cuando los procesos celulares permitan que el comportamiento de estro se inicie; ya que, se ha mostrado que la P y los agentes no esteroideos (GnRH, PGE2) actúan en el hipotálamo para facilitar el comportamiento de lordosis (Rodríguez-Sierra y Komisaruk 1982). De tal forma que el uso de inhibidores farmacológicos, por ejemplo de las cinasas, reducen el comportamiento de estro inducido por la P, por algunos de sus metabolitos reducidos en el anillo A, o por agentes no

esteroidales (GnRH, PGE2, Leptina) o la EVC en ratas hembras previamente estrogenizadas (González-Flores y Etgen 2004, González-Flores y cols. 2004, 2006, 2008, García-Juárez y cols. 2011, 2012). El mecanismo a través del cual estas cinasas facilitan el comportamiento de estro, no ha sido esclarecido pero aparentemente involucra al RP, debido a que la administración concurrente de la antiprogestina RU486 (que bloquea al RP) inhibe el comportamiento de estro inducido por todas las progestinas en ratas hembras previamente estrogenizadas (González-Mariscal y cols. 1989, Beyer y cols. 1995). Generalmente se considera que el RP presenta muchos de estos efectos biológicos, porque actúa como un factor de transcripción a nivel genómico. No obstante, diversos estudios indican que los RPs producen respuesta celular independientemente de activar a la maquinaria transcripcional (Wehling 1997, Revelli y cols. 1998, Watson y Gametchu 1999), a través de varios mecanismos de señalización membranal, entre estos está la vía Src/MAPK. El sistema Src se ha descrito en una serie de experimentos relacionados con el estudio del desarrollo y la diferenciación celular, el Src se encuentra formado por una serie de subunidades globulares, como la SH2 y la SH3 y es capaz de unirse al RP y al RE. De tal forma que la interacción del RP y el RE con el c-Src permite una rápida estimulación de la vía Src/Raf/MAPK (Migliaccio y cols. 1998, Boonyaratanakornkit y cols. 2001, Ballare y cols. 2003, Edwards 2005, Faivre y Lange 2007). Nosotros recientemente hemos propuesto que la activación de Src, a través del RP, podría ocurrir no solo por la acción de la P, sino también con la de sus metabolitos reducidos en el anillo A y por otros agentes. Así, encontramos que la administración del inhibidor específico de de la cinasa Src, 4-amino-5-(4-chlorophenil)-7-(t-butil) pirazolo [3,4-d] pirimidine (PP2; Hanke y cols. 1996, Li y cols. 2006), bloqueó la conducta de estro inducida por progestinas en configuración  $\alpha$ .

### 3. JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo de tesis es parte de una línea de investigación que tiene como fin, el aportar información que permitan entender los mecanismos celulares y moleculares que controlan la conducta sexual femenina. Como mostramos en trabajos previos, nuestro grupo de investigación ha propuesto diferentes mecanismos por los cuales diversos agentes inducen la conducta sexual femenina, dentro de estos mecanismos nos ha interesado el papel que tiene las proteínas cinasa y los esteroides sobre esta conducta. Recientemente mostramos que la cinasa Src bloqueó la conducta de estro inducida por progestinas en configuración  $\alpha$ . Sin embargo, la participación de la cinasa Src por otras progestinas y por otros agentes facilitadoras de la conducta sexual femenina no ha sido explorada.



#### **4. HIPÓTESIS**

La cinasa Src y el receptor de estrógenos participan en la expresión de conducta sexual femenina inducida por metabolitos de la progesterona reducidos en el anillo A, por agentes no esteroideos o por la EVC.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo General**

Explorar si la conducta sexual femenina inducida por diversos agentes, involucra la participación de la cinasa Src y del RE en ratas ovariectomizadas implantadas intracerebroventricularmente (icv) y pretratadas con BE.

### **5.2 Objetivos Particulares**

1. Determinar la participación de la cinasa Src en la expresión de la conducta de lordosis inducida por progestinas  $5\beta$  reducidas en el anillo A.
2. Determinar la participación de la cinasa Src en la expresión de la conducta de lordosis inducida por LHRH, PGE2 y la EVC.
3. Determinar la participación del RE sobre la conducta de lordosis inducida por progestinas, LHRH, PGE2 y la EVC.

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1. Animales.**

Se utilizaron 285 ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley, con un peso de 200-280 grs, de la colonia del Centro de Investigación en Reproducción Animal CINVESTAV-UAT, laboratorio Panotla, Tlaxcala. Los animales se mantuvieron a una temperatura de  $23 \pm 2$  °C, con un ciclo invertido de luz-obscuridad (14 hrs luz: 10 hrs obscuridad, la luz se apaga a las 10:00 a.m.) y fueron alimentados con nutricubos (Purina) y agua a libre acceso.

### **6.2. Cirugías.**

Las hembras fueron ovariectomizadas bajo anestesia con xilacina (4 mg/kg) y ketamina (80 mg/kg) por vía intraperitoneal. Una semana después, las hembras fueron implantadas con una cánula guía de acero inoxidable (calibre 22, de 17 mm de longitud) dirigida al ventrículo cerebral derecho, mediante cirugía estereotáxica, bajo el mismo protocolo de anestesia y siguiendo las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (2006; anterior-posterior +0.80 mm, mediolateral 1.5 mm, dorsoventral -3.5 mm con respecto a bregma). Al finalizar la cirugía cada hembra recibió una dosis de penicilina (22000 UI/kg) y fue alojada en una caja individual para su recuperación.

### **6.3. Fármacos.**

El benzoato de estradiol (BE<sub>2</sub>), P, 5 $\alpha$ -pregnan-3,20-dione (5 $\alpha$ -DHP), 5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-one (5 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -Pgl), 5 $\beta$ -pregnan-3,20-dione (5 $\beta$ -DHP), 5 $\beta$ -pregnan-3 $\beta$ -ol-20-one (5 $\beta$ ,3 $\beta$ -Pgl), GnRH, PGE<sub>2</sub>, ICI (7 $\alpha$ -[9-(4,4,5,5,5-pentafluoropentylsulfanyl)nonyl]estra-1,3,5-(10)-triene-3,17 $\beta$ -diol) y el tamoxifen fueron adquiridos de Sigma Chemical, Inc. (St. Louis, MO). El PP2 4-amino-5-(4-clorofenil)-7-(t-butil)pirazolo [3,4-d]pirimidina (inhibidor de la cinasa Src), se obtuvo de Calbiochem (La Jolla, CA, EUA). El BE<sub>2</sub> fue disuelto en aceite de cártamo a una concentración de 50 $\mu$ g/ml, al igual que los esteroides P y las progestinas 5 $\beta$  reducidas (130ng/ $\mu$ l) y las 5 $\alpha$  reducidas (13ng/ $\mu$ l). El PP2 (30 $\mu$ g/2 $\mu$ l) fue disuelto en dimetilsulfoxido (DMSO) al 10%. En solución salina estéril se prepararon la GnRH (50 $\mu$ g/ $\mu$ l) y la PGE<sub>2</sub> (1 $\mu$ g/ $\mu$ l). Cabe señalar que el tamoxifen no produjo la supresión de comportamiento generalizado, y que este compuesto ha sido ampliamente utilizado en los estudios de comportamiento sexual femenino. Por otra parte, se ha informado de que el tamoxifen puede



funcionar como un neuroprotector contra la neurotoxicidad inducida por metanfetamina en las mujeres (Dluzen y Mickley 2005). En ese estudio, el tamoxifen incrementó varios comportamientos locomotores, como la actividad horizontal, el número de movimientos y la distancia total recorrida.

#### **6.4. Evaluación de la conducta sexual femenina.**

Las hembras fueron sometidas a pruebas de conducta sexual con machos sexualmente expertos, dentro de arenas circulares de Plexiglas de 60cm de diámetro a los 60, 120 y 240 min después de la administración de los agentes activadores de la conducta sexual. La prueba duró hasta que la hembra recibió diez montas por parte del macho y la receptividad sexual fue evaluada a través del cociente de lordosis [CL = (No. de lordosis / 10 montas) (100)]. Las pruebas de comportamiento fueron realizadas a los 60, 120 y 240 min después de la administración los tratamientos o de la estimulación vaginocervical.

#### **6.5. Comprobación del área de implante.**

Al finalizar las pruebas las hembras fueron sacrificadas por inhalación de éter. Enseguida se inyectó un colorante (azul de metileno al 2%) a través de la cánula y se procedió a extraer el cerebro en fresco. Inmediatamente después se le practicó un corte transversal a la altura del orificio dejado por la cánula. De esta manera se comprobó si la cánula se encontraba en el ventrículo cerebral derecho.

### **6.6. DISEÑO EXPERIMENTAL**

#### **6.6.1. Experimento 1: efecto del PP2 sobre el comportamiento estral inducido por 5 $\beta$ -DHP o 5 $\beta$ , 3 $\beta$ -Pgl.**

Una semana después de la implantación de una cánula en el ventrículo lateral, las ratas fueron inyectadas s.c. con 5 $\mu$ g de E<sub>2</sub>B (hora 0) y 39,5 h más tarde recibieron una infusión icv de 10% de DMSO / 1  $\mu$ l (vehículo para PP2); 30 minutos más tarde (40 h después de la E<sub>2</sub> B) que recibieron vehículo (1  $\mu$ l de aceite de cártamo, n = 8) o las progestinas: 130 ng de cualquiera de 5 $\beta$ -DHP (n = 10) o 5 $\beta$ , 3 $\beta$ -Pgl (N = 9). Todos los compuestos se infundieron icv en un volumen de 1  $\mu$ l a través de un catéter de plástico (Clay Adams, PE 10 N ° 7401) ajustado a una jeringa

Hamilton (10  $\mu$  l) insertada en la cánula guía. La dosis de progestinas utilizadas se obtuvieron de un estudio previo que demuestra que son eficaces en la obtención de los comportamientos del estro en ratas OVX previamente estrogenizadas (5  $\mu$ g de E<sub>2</sub>B) (Gómora-Arrati y cols. 2008). Los animales de los grupos experimentales recibieron una infusión icv de 30  $\mu$ g de PP2 (disuelto en 10% de DMSO) 39,5 h después de 5  $\mu$ g de E<sub>2</sub>B; y 40 h (es decir, 30 min después de PP2) 130 ng de 5 $\beta$ -DHP (n = 8) o 5 $\beta$ , 3 $\beta$ -Pgl (n = 8) en 1  $\mu$ l de aceite de cártamo por la misma vía de administración.

#### **6.6.2. Experimento 2:** efecto de PP2 sobre el comportamiento estral inducido por GnRH y PGE<sub>2</sub>.

Animales Ovx fueron estrogenizados con 5  $\mu$ g de E<sub>2</sub>B, y 39,5 horas más tarde fueron infundidos icv con DMSO al 10% / 1  $\mu$ l. Treinta minutos más tarde (40 h después del E<sub>2</sub>B) recibieron una infusión icv de 1  $\mu$ l de solución salina (control, n = 8) o 50 ng de GnRH (n = 9) o 1  $\mu$ g de PGE<sub>2</sub> (n = 9). Las dosis de GnRH y PGE<sub>2</sub> usadas son eficaces en la inducción de la conducta estral en ratas OVX previamente estrogenizadas (5  $\mu$ g de E<sub>2</sub>B) (Ramírez-Orduña y cols. 2007). En lugar de solo DMSO, las ratas recibieron 30  $\mu$ g de PP2 infundido icv a 39,5 h después de la inyección de E<sub>2</sub>B y 30 minutos más tarde, ya sea 50 ng de GnRH (n = 9) o 1 mg de PGE<sub>2</sub> (n = 8).

#### **6.6.3. Experimento 3:** efecto de PP2 sobre el comportamiento estral inducido por estimulación manual de los flancos (MF) más EVC.

Ratas OVX fueron inyectados con 5  $\mu$ g de E<sub>2</sub>B. Cuarenta horas después, los animales se dividieron en dos grupos de tratamiento. Las ratas de control recibieron 1  $\mu$ l de DMSO (10%) y 30 minutos más tarde MF / EVC (n = 10); las ratas del segundo grupo recibieron 30  $\mu$ g de PP2 en DMSO y 30 minutos más tarde MF / EVC (n = 13). La MF consistió en palpaciones aplicadas con el índice y el pulgar a ambos flancos y con la palma de la mano a la zona perineal. La EVC consistió en aplicar una presión de 150 g en la vagina y el cuello uterino a través de una sonda vaginal junto con MF durante unos 5 s (González-Flores y cols. 2007).



**6.6.4. Experimento 4:** efecto del tamoxifen sobre el comportamiento estral inducido por P y  $5\alpha$ -y  $5\beta$ -progestinas reducidas.

Una semana después de la colocación de la cánula, todas las hembras fueron inyectadas sc con  $5\mu\text{g}$  de  $\text{E}_2$  B. A las 39,5 h después del  $\text{E}_2$  B tamoxifen o vehículo oleoso fue infundido, y 40 minutos después del  $\text{E}_2$  B se infundieron las progestinas. Las progestinas y el tamoxifen fueron disueltos en aceite de cártamo sésamo e inyectadas con las siguientes dosis: 130 ng de P (n = 8),  $5\beta$ -DHP (n = 8) y  $5\beta$ ,  $3\beta$ -Pgl (n = 8) y 13 ng de  $5\alpha$ -DHP (n = 8) y  $5\alpha$ ,  $3\alpha$ -Pgl (n = 9). Estas dosis se seleccionaron a partir de curvas de dosis-respuesta establecidos previamente en nuestro laboratorio (González-Flores y cols. 2006). Otros grupos de hembras fueron inyectados icv a 39,5 h después de  $\text{E}_2$  B con 5 mg de tamoxifen y 30 minutos más tarde recibieron las siguientes progestinas: 130 ng de P (n = 9),  $5\beta$ -DHP (n = 9) y  $5\beta$ ,  $3\beta$ -Pgl (n = 9) y 13 ng de  $5\alpha$ -DHP (n = 8) y  $5\alpha$ ,  $3\alpha$ -Pgl (n = 9). La dosis de tamoxifen fue seleccionada a partir de estudios anteriores que muestran su eficacia para interferir con la activación de ER (McKenna y cols. 1992).

**6.6.5. Experimento 5:** efecto del tamoxifen sobre el comportamiento estral inducidas por GnRH y PGE2.

Una semana después de la colocación del implante, todas las hembras fueron inyectadas sc con  $5\mu\text{g}$  de  $\text{E}_2$  B y 39,5 horas más tarde recibieron una infusión icv de vehículo (aceite), seguido a las 40 h por la GnRH o PGE2 como se describe en el experimento 1. La GnRH se disolvió en agua destilada y se infundió a una concentración de 50 ng /  $1\mu\text{l}$  (n = 9). La PGE2 (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) se disolvió en solución salina. Otros grupos de hembras fueron inyectados icv a 39,5 h después del  $\text{E}_2$  B con 5 mg de tamoxifen y 30 min más tarde recibieron 50 ng /  $1\mu\text{l}$  de GnRH (n = 9) o 1  $\mu\text{g}$  /  $1\mu\text{l}$  de PGE2 por vía icv (n = 9).

**6.6.6. Experimento 6:** Efecto del tamoxifen sobre el comportamiento estral inducido por la EVC.

Cuarenta horas después de la inyección del  $\text{E}_2$  B y 30 min después de la infusión del vehículo (aceite), 9 hembras recibieron EVC (una fuerza de 150 g aplicada contra el cuello uterino con un émbolo de vidrio a partir de una jeringa de 1 ml insertado en la vagina). La EVC consistió



aplicar una presión de 150 g en la vagina y el cuello uterino a través de una sonda vaginal junto con MF durante unos 5 s (González-Flores y cols. 2007).

Unas hembras fueron inyectadas icv a 39,5 h después del E<sub>2</sub>B con 5 mg de tamoxifen y 30 minutos más tarde recibieron la EVC (n = 9).

**6.7. Experimento 7:** efecto del ICI, un antagonista puro de ER, sobre el comportamiento estral inducido por la P y la GnRH.

Este experimento se realizó para confirmar que el comportamiento estral inducido por P y la GnRH, las cuales muestran inducción de lordosis con resultados similares en ratas hembra Ovx previamente estrogenizadas. Hemos utilizado el antagonista del ER puro, ICI, porque tiene poca o ninguna actividad agonista (Wakeling y Bowler 1987). Una semana después de la colocación de la cánula, todas las hembras fueron inyectadas sc con 5 µg de E<sub>2</sub>B y 39,5 horas más tarde, 100 µg de ICI o el vehículo fue infundido icv. Treinta minutos después de la administración del vehículo o de ICI, 130 µg de P (n = 9) o 50 ng de GnRH (n = 9) fueron infundidos icv.

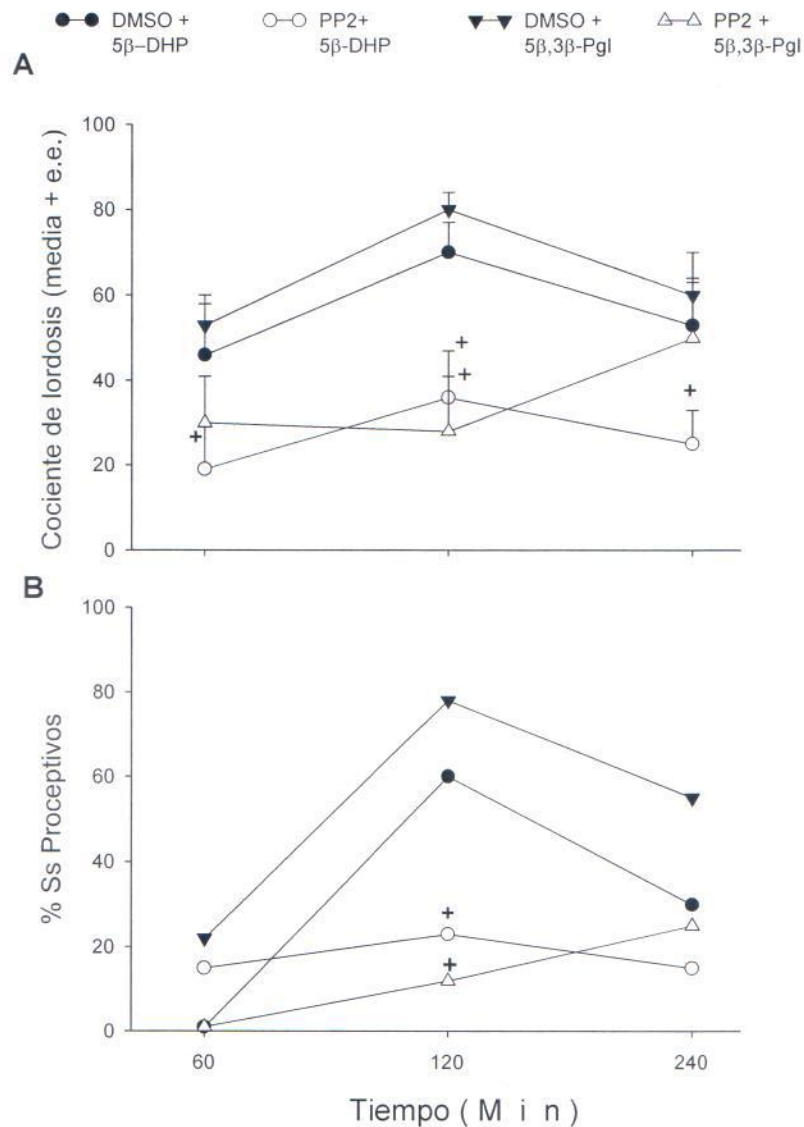
#### 6.7. Análisis estadístico

Para comparar el efecto del PP2 y tamoxifen como una función de tiempo después de la aplicación del agente lordogénico se usó un análisis de varianza para datos no paramétricos, Prueba de Friedman. La prueba post hoc de U-Mann-Whitney se aplicó para comparar los dos grupos independientes. Para analizar la proporción de hembras proceptivas se utilizó la prueba de probabilidad exacta de Fisher. Las diferencias se consideraron significativas si la probabilidad fue igual o menor a 0.05 ( $P \leq 0.05$ ; Siegel y Castellan 1995).

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Experimento 1: efecto del PP2 sobre el comportamiento de estro inducido por $5\beta$ -DHP o $5\beta, 3\beta$ -Pgl

En la Fig. 10A se muestra, que la infusión icv de ambas progestinas  $5\beta$ -reducidas aumentaron significativamente el comportamiento de la lordosis, en los tres intervalos de tiempo probados en comparación con los animales control, a los que se les administró  $E_2$  B y fueron infundidos icv con aceite (Friedman:  $F = 52$ ,  $df = 2, 32$ ,  $p < 0,01$ ). El  $E_2$  B solo, no pudo inducir ya sea lordosis o proceptividad en nuestros animales Ovx. El curso temporal de la respuesta de las dos progestinas fue similar, con valores LQ máximos se observan a los 120 min ( $F = 46,8$ ,  $df = 2, 31$ ,  $p < 0,001$ ). Las dos progestinas también indujeron comportamiento proceptivo en la mayoría de las hembras; la máxima proceptividad fue observada a los 120 min (Fig. 10B) (múltiple chi = 18,0,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ). Por otro lado la administración de PP2, redujo significativamente los valores de LQ en animales infundidos con  $5\beta$ -DHP en todos los tiempos probados (Fig. 10A). Las hembras que recibieron  $5\beta, 3\beta$ -Pgl, PP2 presentaron inhibición significativa de la lordosis sólo a los 120 min después de la infusión de la progestina ( $p < 0,01$ ). El PP2 redujo los comportamientos proceptivos inducidos por ambas progestinas en la prueba de 120 minutos (Fig. 10B  $p < 0,05$  para  $5\beta$ -DHP,  $p < 0,01$  para  $5\beta, 3\beta$ -LGP), pero no a los 60 o 240 min.

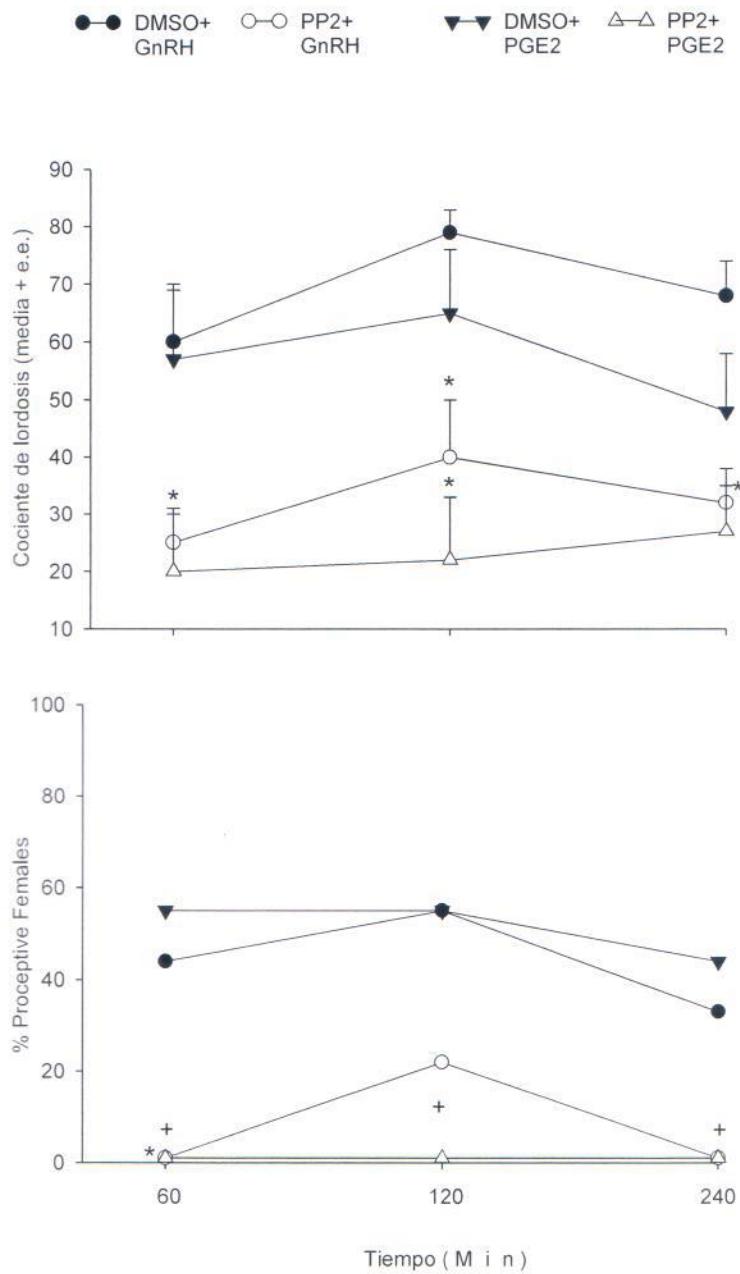


**Figura 10.** Efecto de la infusión icv del PP2 (30µg), un inhibidor de la cinasa Src, sobre la conducta de lordosis (A) y proceptividad (B) inducida por la administración de 130ng de 5β-DHP (n=10) y 5β,3β-Pgl (n=9). El PP2 fue infundido 30 minutos antes de las progestinas. La infusión de progestinas 5β-reducidas activó la conducta de lordosis durante los tres intervalos de prueba. La administración del inhibidor de la Src redujo en forma significativa el comportamiento de lordosis y la proceptividad inducida por ambas progestinas. <sup>+</sup>p<0.05.



## 7.2. Experimento 2: Efecto del PP2 sobre el comportamiento de estro inducido por GnRH y PGE<sub>2</sub>

La Fig. 11 muestra los efectos sobre el comportamiento de lordosis como de la proceptividad por la administración icv de 50 ng de GnRH y 1 µg de PGE<sub>2</sub> solos o en combinación con 30 µg de PP2. A estas dosis, ambos fármacos indujeron comportamiento de lordosis y proceptividad altamente significativa, con la mejor respuesta obtenida a 120 min ( $F = 19,9$ ,  $df = 1, 32$ ,  $p < 0,001$ ; chi cuadrada múltiple = 17,6,  $df = 2$ ,  $p < 0,01$ ; respectivamente), en comparación con los animales de control (E<sub>2</sub> B más solución salina). El PP2 bloqueó significativamente la lordosis inducida por GnRH en todos los tiempos probados ( $p < 0,01$ ) y también redujo en forma significativa la proceptividad a los 60 y 120 min ( $p < 0,05$ ). El PP2 también disminuyó la facilitación de la lordosis inducida por la PGE<sub>2</sub> a los 60 y 120 min después de la infusión y de los comportamientos proceptivos en los tres intervalos de tiempo probados ( $p < 0,05$ ).

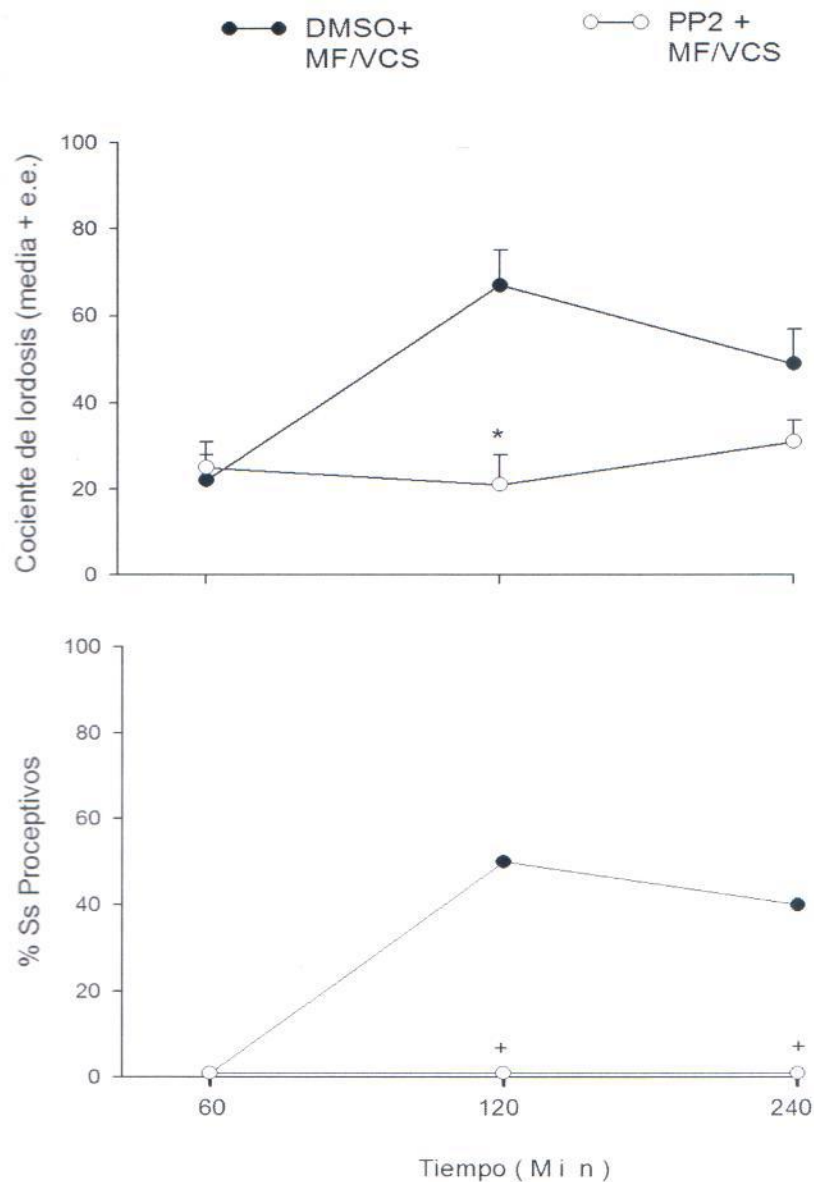


**Figura 11.** Efecto de PP2 sobre el comportamiento estral inducido por GnRH y PGE2. La **facilitación** de lordosis (A) y proceptividad (B) en ratas ovx pretratadas con BE2 producida por 50ng de GnRH (n=9) o 1 µg de PGE<sub>2</sub> (n= 9) fue antagonizada por la infusión del inhibidor de la cinasa Src, PP2 (30µg). Para la GnRH la inhibición se presentó en los tres tiempos probados. <sup>+</sup>p<0.05; <sup>\*</sup>p<0.01.

**7.3. Experimento 3:** efecto de PP2 sobre el comportamiento de estro inducido por estimulación manual de los flancos (MF) más la EVC.

La Fig. 12 muestra el efecto de PP2 sobre los comportamientos de estro (lordosis y proceptividad) inducidas por MF /EVC. En contraste con el curso temporal de la respuesta de comportamiento obtenido con progestinas, GnRH y PGE<sub>2</sub>, la respuesta a MF / VCS se retrasó hasta 120 minutos después de la estimulación. La administración icv de PP2 30 min antes de MF / VCS redujo significativamente la lordosis a 120 min y suprimió el comportamiento proceptivo a 120 y 240 min ( $p < 0,05$ ).

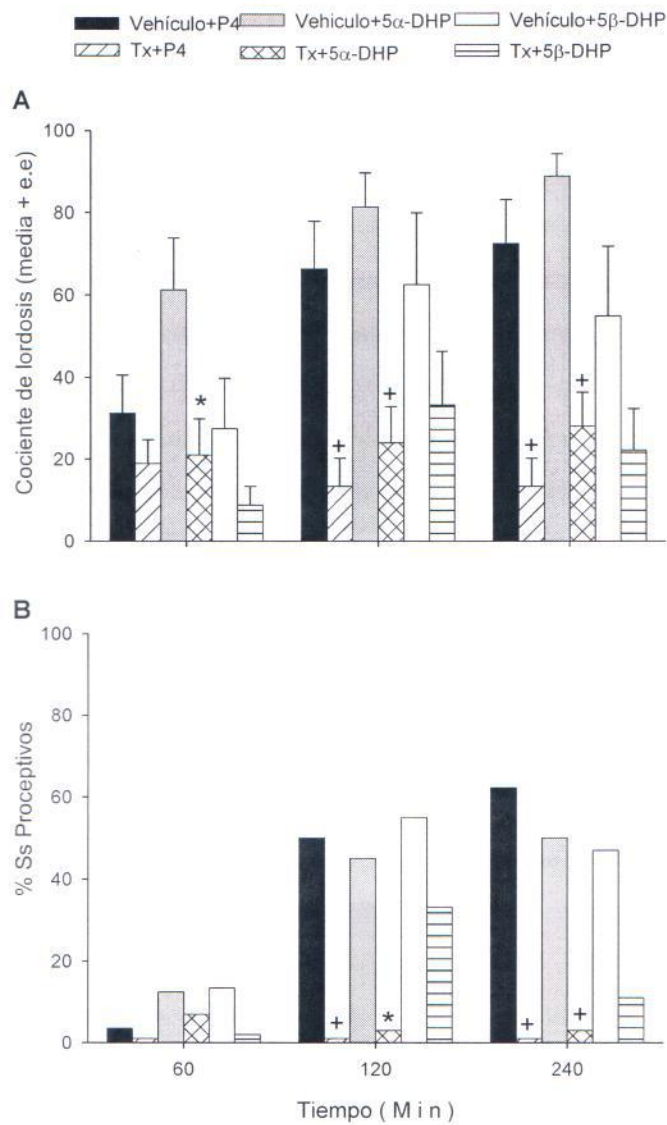




**Figura 12.** efecto de PP2 sobre el comportamiento estral inducido por estimulación manual de los flancos (MF) más EVC. La facilitación de lordosis (A) y proceptividad (B) en ratas ovariectomizadas pretratadas con BE2 producida por la VCS fue antagonizada por la infusión icv del inhibidor de la Src, PP2 (30 µg). +p<0.05; \*p< 0.01.

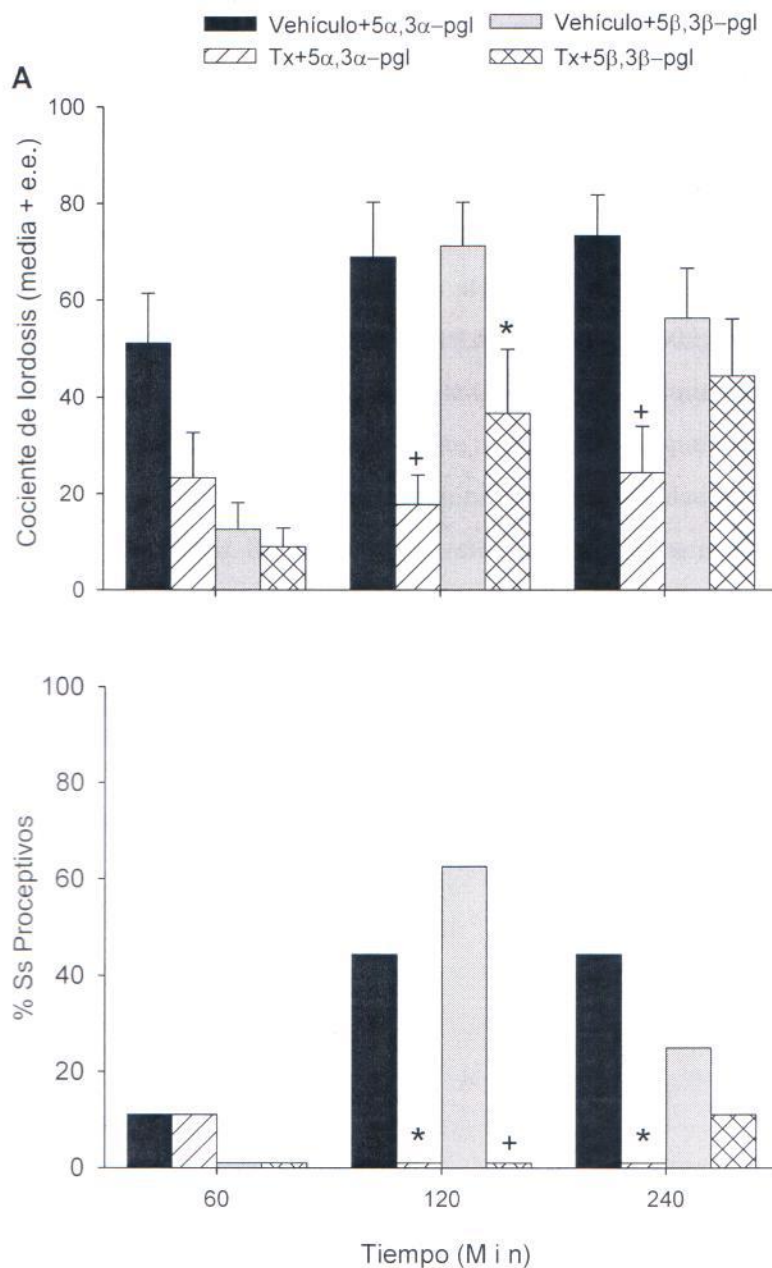
**7.4. Experimento 4:** efecto del tamoxifen sobre el comportamiento de estro inducido por P y  $5\alpha$ - y  $5\beta$ -progestinas reducidas.

La prueba de Friedman mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos que recibieron progestágeno solo o progestina más tamoxifen en los tres tiempos probados (P,  $F = 21$ ,  $df = 5$ ,  $p < 0,001$ ;  $5\alpha$ -DHP,  $F = 31$ ,  $df = 5$ ,  $p < 0,001$ ;  $5\beta$ -DHP,  $F = 12,7$ ,  $df = 5$ ,  $p < 0,02$ ). En las hembras que recibieron P, el tamoxifen inhibió la lordosis en forma significativa a los 120 ( $p < 0,01$ ) y 240 minutos ( $p < 0,01$ ) después de la inyección de la progestina. El tamoxifen significativamente redujo las puntuaciones de LQ en los animales infundidos con  $5\alpha$ -DHP a 60 ( $p < 0,05$ ), 120 ( $p < 0,01$ ) y 240 minutos ( $p < 0,01$ ; Fig. 13A). Las tres progestinas también indujeron el comportamiento proceptivo en la mayoría de las hembras; la proceptividad máxima se observó a 120 min con  $5\beta$ -DHP (Fig. 13B) y en 240 minutos con P y  $5\alpha$ -DHP. El tamoxifen suprimió los comportamientos proceptivos inducidos por P ( $p < 0,01$ ) y  $5\alpha$ -DHP (0.05) en las pruebas 120 y 240 min (Fig. 13B  $P < 0,01$  para ambas progestinas), pero no afectó la proceptividad inducida por  $5\beta$ -DHP. La prueba de Friedman también mostró diferencias estadísticamente significativas entre las ratas que recibieron pregnanolonas ( $5\alpha$ ,  $3\alpha$ -Pgl y  $5\beta$ ,  $3\beta$ -Pgl) solas o en combinación con el tamoxifen en los tiempos evaluados ( $5\alpha$ ,  $3\alpha$ -Pgl,  $F = 15$ ,  $df = 5$ ,  $p < 0,01$ ;  $5\beta$ ,  $3\beta$ -Pgl,  $F = 19,9$ ,  $df = 5$ ,  $p < 0,001$ ). Por la tanto, la Fig. 14A muestra que la infusión icv de 13 ng de  $5\alpha,3\alpha$ -Pgl facilitó la lordosis a los 60 minutos y su acción continuó hasta 240 minutos, mientras que  $5\beta$ ,  $3\beta$ -Pgl indujo comportamiento lordosis a los 120 y 240 min. El tamoxifen redujo significativamente el comportamiento de lordosis inducido a los 120 min para  $5\alpha$ ,  $3\alpha$ -Pgl ( $p < 0,01$ ) y  $5\beta$ ,  $3\beta$ -Pgl ( $p < 0,05$ ). La lordosis inducida a los 240 min por la  $5\alpha$ ,  $3\alpha$ -Pgl también se inhibió por el tamoxifen ( $p < 0,01$ ). Las dos pregnanolonas también indujeron claro comportamiento proceptivo a los 120 min en la mayoría de las hembras como se puede observar en la Fig. 14B, aunque la proceptividad inducida por  $5\beta$ ,  $3\beta$ -Pgl es baja a los 240 min. El tamoxifen redujo significativamente el comportamiento proceptivo inducido por la  $5\alpha$ ,  $3\alpha$ -Pgl a 120 ( $p < 0,05$ ) y 240 min ( $p < 0,05$ ) y la proceptividad inducida por  $5\beta$ ,  $3\beta$ -Pgl sólo a los 120 minutos ( $p < 0,01$ ).



**Figura 13:** Efecto del tamoxifen sobre el comportamiento estral inducido por P y 5α- y 5β-progestinas reducidas. Se observa una inducción de la conducta de lordosis (A) y de la proceptividad (B) en ratas pretratadas con E2 por la infusión icv de 130 ng de P (n= 8), 5β-DHP (n= 8) y por 13 ng de 5α-DHP (n=8). La administración icv de 5 μg de tamoxifen (Tx) antagonizó la conducta de estro inducida por P (n= 9), 5β-DHP (n= 14) y 5α-DHP (n= 11). \*P<0.01; \*P<0.05 vs el grupo que recibió la correspondiente combinación del vehículo + la progestina.

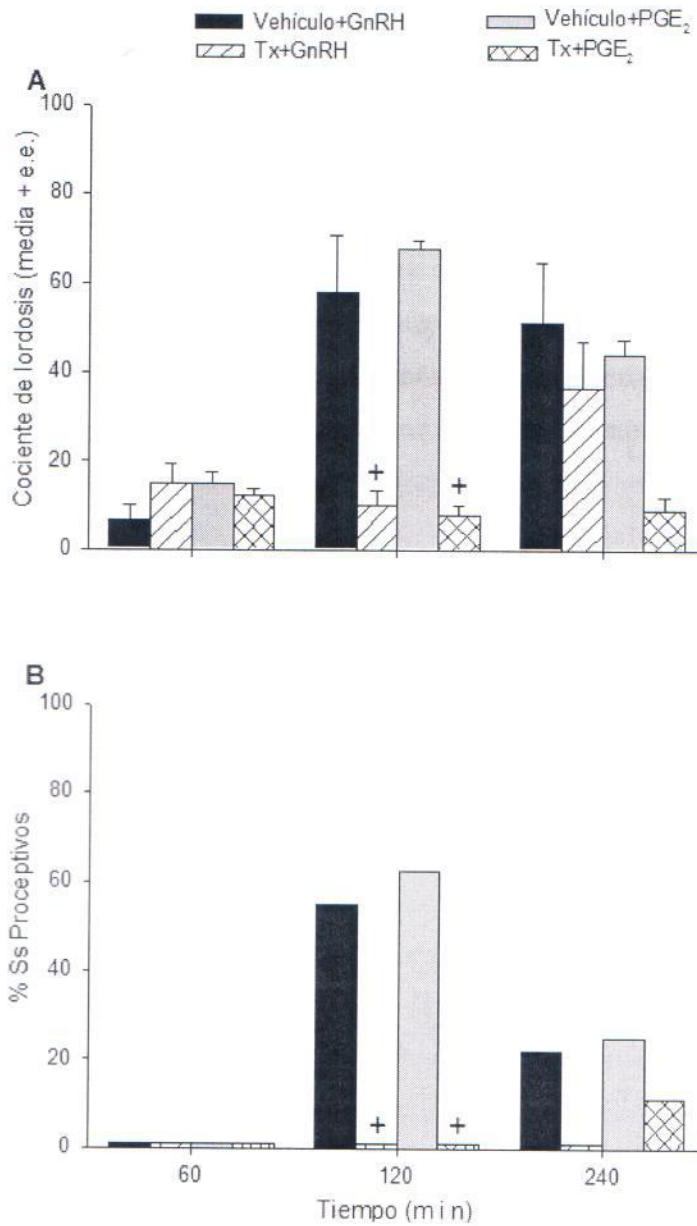




**Figura 14.** Efecto del tamoxifen sobre el comportamiento estral inducido por 5 $\alpha$ - y 5 $\beta$ -progestinas reducidas. Inducción de la conducta de lordosis (A) y de la proceptividad (B) en ratas pretratadas con BE2 por la infusión icv de 13 ng de 5 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -Pgl (n= 9) y 5 $\beta$ ,3 $\beta$ -Pgl (n= 8). Nuevamente la administración icv de 5  $\mu$ g de tamoxifen (Tx) antagonizó la conducta de estró inducida por 5 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -Pgl (n= 9) y 5 $\beta$ ,3 $\beta$ -Pgl (n= 9). +P<0.01; \*P<0.05 vs el grupo que recibió la correspondiente combinación del vehículo + la progestina reducida en el anillo A.

**7.5. Experimento 5:** efecto del tamoxifen sobre el comportamiento de estro inducido por GnRH y PGE2.

La Fig. 15A muestra el comportamiento de lordosis inducido por 50 ng de GnRH y por 1 µg de PGE2 administrados icv. La prueba de Friedman mostró diferencias estadísticamente significativas entre los animales que recibieron estos péptidos solos o en combinación con tamoxifen en los tiempos probados (GnRH,  $F = 19,5$ ,  $df = 5$ ,  $p < 0,002$ ; PGE2,  $F = 19$ ,  $df = 5$ ,  $p < 0,002$ ). En 120 minutos después de la infusión de GnRH el grupo que recibió el tamoxifen en combinación con GnRH exhibió significativamente menos lordosis que las que se les administró solo la GnRH ( $p < 0,01$ ), el tamoxifen también inhibió la proceptividad inducida en este tiempo ( $p < 0,01$ ) Fig. 15B. La PGE2 indujo bajos niveles de lordosis a los 60 min y no indujo proceptividad a este tiempo (Fig. 16B). El mayor cociente de lordosis y de proceptividad se observó a los 120 min para disminuir a los 240 min. El comportamiento proceptivo inducido por PGE2 fue completamente abolido a los 120 min ( $p < 0,001$ ).

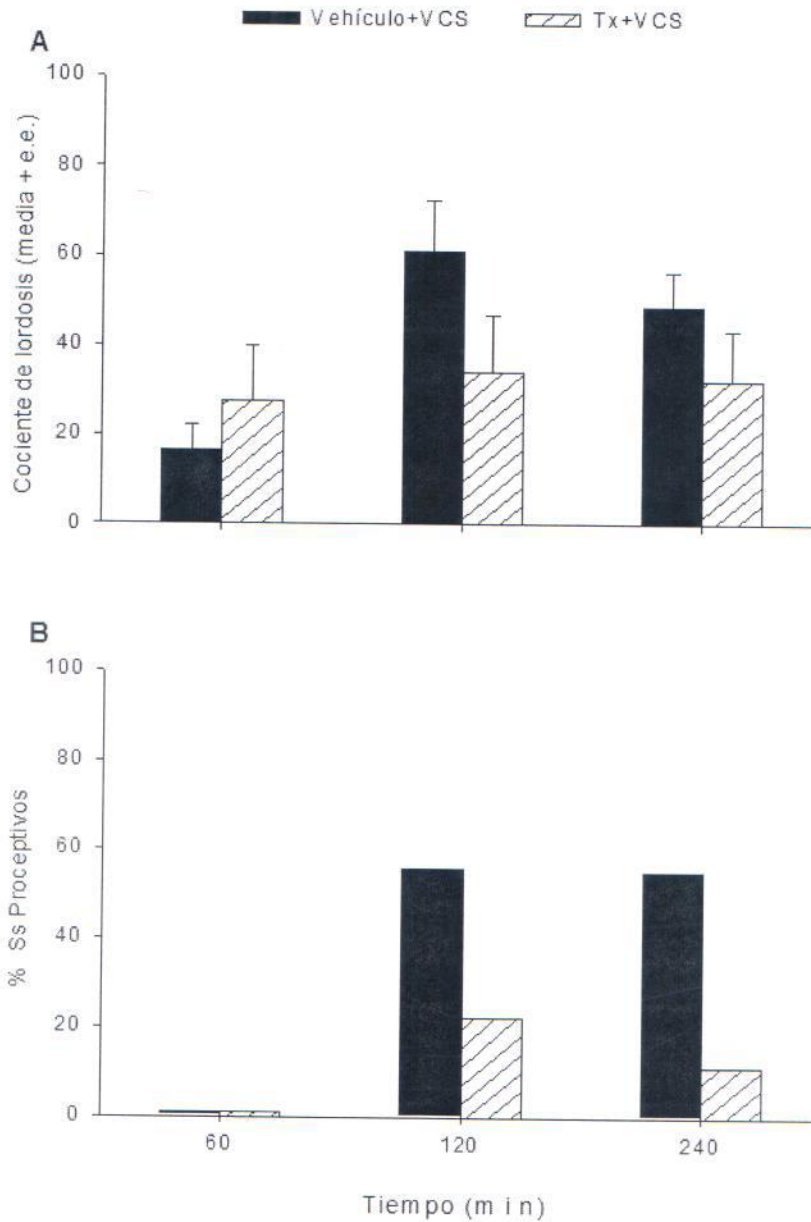


**Figura 15.** Efecto del tamoxifen sobre el comportamiento estral inducidas por GnRH y PGE<sub>2</sub>. La conducta de lordosis (A) y la proceptividad (B) en ratas pretratadas con E<sub>2</sub> por la infusión icv de 50 ng de GnRH (n= 9) y 1µg de PGE<sub>2</sub> (n= 8), fue reducida en forma significativa por la administración icv de 5 µg de tamoxifen (Tx, <sup>+</sup>P<0.01; \*P<0.05).



**7.6. Experimento 6:** Efecto del tamoxifen sobre el comportamiento de estro inducido por la EVC.

La prueba de Friedman no mostró diferencias significativas entre los grupos que recibieron EVC y los combinados con tamoxifen en los tres tiempos probados (EVC,  $F = 11,6$ ,  $df = 5$ ,  $p < 0,039$ ). La EVC indujo bajos niveles de comportamiento de la lordosis en 60 min y no indujo proceptividad a este tiempo (Fig. 16A). El mayor cociente de lordosis se observó a los 120 min para disminuir a los 240 min de aplicada la EVC. El comportamiento de lordosis inducido por la EVC no fue reducido en forma significativa por el tamoxifen. En referencia a la proceptividad inducida por la EVC, el tamoxifen no tuvo ningún efecto significativo sobre su reducción como se puede observar en la Fig. 16B.

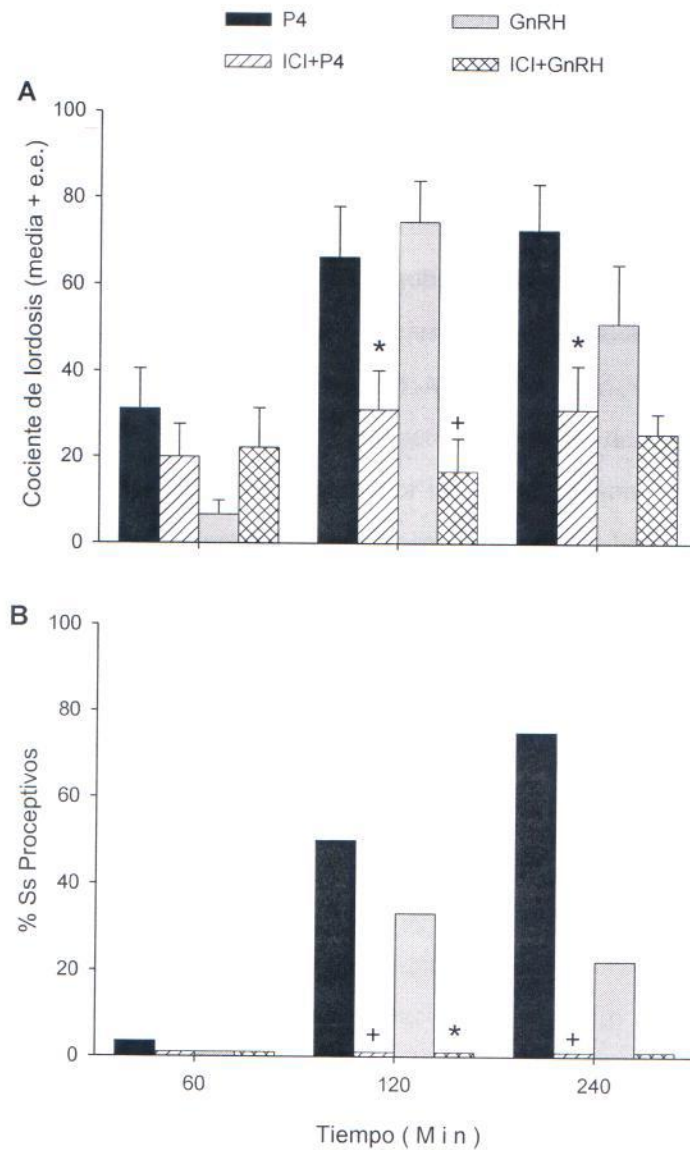


**Figura 16.** Efecto del tamoxifen sobre el comportamiento estral inducido por la EVC. Aunque se puede observar una reducción de la conducta de estro y de la proceptividad inducida por la EVC por la infusión del tamoxifen a los 120 y 240 min; esta reducción no fue significativa.

**7.7. Experimento 7:** efecto del ICI, un antagonista puro de ER, sobre el comportamiento de estro inducido por la P y la GnRH.

Como se muestra en Fig 17A la prueba de Friedman mostró diferencias estadísticamente significativas entre los animales que recibieron P o de GnRH solos o en combinación con ICI en los tiempos evaluados (P,  $F = 15,7$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ; GnRH,  $F = 12,1$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,01$ ). La administración de 100  $\mu\text{g}$  de ICI 30 min antes de 130 ng de P o 50 ng de GnRH inhibieron el comportamiento de la lordosis inducida por estos agentes a los 120 minutos ( $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ , respectivamente) y también inhibió el efecto de P en 240 min ( $p < 0,05$ ). La proceptividad inducida por P y de la GnRH también se suprimió significativamente por ICI a 120 ( $p < 0,01$  y  $0,05$ , respectivamente), y en 240 min tamoxifen también disminuyó la proceptividad inducida por P ( $p < 0,01$ ) como se puede apreciar en la Fig. 17B.





**Figura 17.** Efecto del ICI, un antagonista puro de ER, sobre el comportamiento estral inducido por la P y la GnRH. La inducción de la conducta de lordosis (A) y proceptividad (B) en ratas pretratadas con E2 por la infusión icv de 130 ng de P ó 50 ng de GnRH, fue antagonizada en forma significativa por la administración de 100 µg de ICI182780.

## 8. DISCUSIÓN

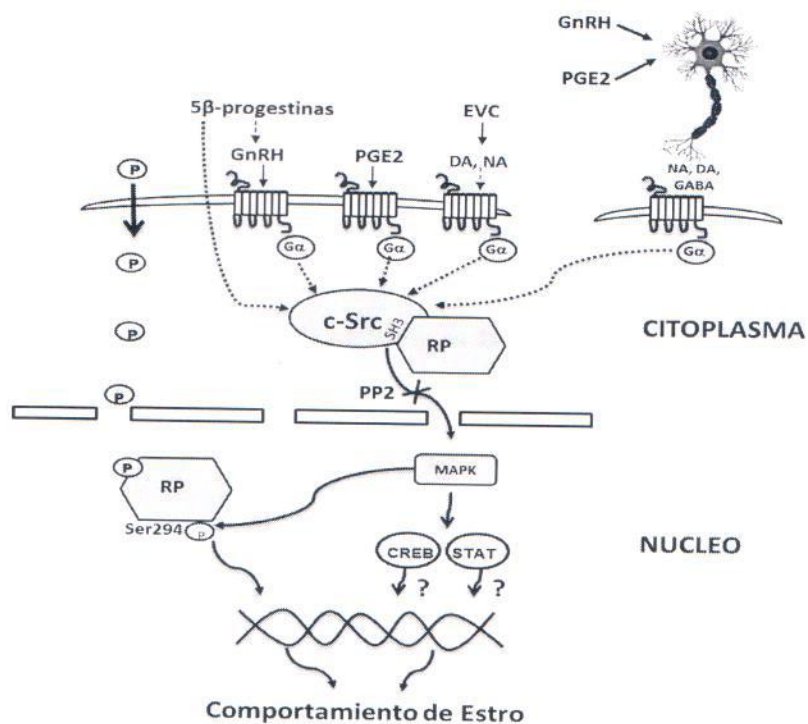
Estos resultados apoyan la hipótesis de que agentes que no se unen al RP, facilitan la conducta de estro al activar la vía de señalización de la Src. Debido a que el PP2 bloqueó el efecto de la P y sus metabolitos reducidos en el anillo A sobre la conducta de estro, al parecer la activación de la cinasa Src es un proceso esencial para la expresión tanto de la conducta lordosis, como de la proceptividad en ratas pretratadas con benzoato de estradiol, independientemente del agente o procedimiento utilizado para estimular dichas conductas (González-Flores et al., 2010). Existe evidencia que muestra que la Src asociada al RP, ejerce su acción al activar la vía de la MAPK (Boonyaratanakornkit et al., 2001; Faivre et al. 2005; Migliaccio et al., 1998). Estudios recientes apoyan este mecanismo, ya que muestran que el efecto facilitatorio de las progestinas reducidas en el anillo A, la GnRH y la PGE<sub>2</sub> es bloqueado por la administración icv de un inhibidor de la MAPK, el PD98059, en ratas ovx-pretratadas con benzoato de estradiol (González-Flores et al., 2004b, 2009).

La activación del complejo RP-Src por los agentes usados en este estudio no es clara. Estos agentes químicos, podrían actuar directamente sobre cualquier neurona donde se ubique el complejo RP-Src o en neuronas que compartan conexiones sinápticas con las anteriores. La activación de las neuronas conectadas sinápticamente, podría liberar neurotransmisores capaces de estimular la conducta de estro, ej., dopamina, norepinefrina, acetilcolina, etc. (ver revisiones, Beyer and González-Mariscal, 1986; Beyer et al., 2003; Blaustein, 2003; Etgen, 2003; Mani, 2006; Mani and Portillo, 2010) al activar las neuronas que contienen el complejo RP-Src. En efecto, existe evidencia de que las progestinas reducidas en el anillo A, actúan parcialmente a través de la liberación de GnRH, ya que un antagonista del receptor GnRH-1, el antide, disminuyó sus efectos sobre la conducta de estro (Gómora-Arrati et al., 2008).

También es probable que la GnRH, la PGE<sub>2</sub> y los pregnanos 5 $\beta$  actúen directamente sobre las neuronas que expresan RP. Esta idea es apoyada por el hallazgo de que dichos agentes facilitan la conducta de lordosis cuando son implantados o infundidos dentro del núcleo ventromedial del hipotálamo, una región con alta densidad de neuronas que contienen RP (Moss and Foreman, 1976; Rodríguez-Sierra and Komisaruk, 1978).

Como se muestra en la figura 18, los agentes efectivos en inducir conducta de lordosis y proceptividad no necesitan interactuar directamente con el complejo RP-Src. Tanto la GnRH





**Figura 18.** Diagrama del posible mecanismo de acción a través del cual las 5β progestinas, GnRH, PGE2 y EVC activan el sistema PR-Src para inducir la conducta de estro en ratas ovx pretratadas con BE2. Como se muestra en la parte superior derecho del diagrama la GnRH y la PGE2 pueden actuar sobre interneuronas que interaccionan con la neurona que contiene el sistema PR-Src, resultando en la liberación de neurotransmisores (dopamina, noradrenalina, GABA, etc.), capaces de estimular la conducta de estro. Similarmente, la EVC estimula la liberación de NA o DA actuando sobre receptores de membrana acoplados a proteínas G. Una acción directa sobre neuronas con el sistema PR-Src se muestra en el lado izquierdo del diagrama. GnRH, PGE2 y monoaminas actuarían sobre receptores de membrana (receptores acoplados a proteínas G, GPCR), para activar segundos mensajeros regulados por cinasas serina/treonina. La estimulación del sistema de GPCR activa a la cinasa Src mediante varios mecanismos, directos e indirectos (líneas cortadas). Las 5β progestinas también estimulan la actividad de la Src actuando en la membrana o indirectamente mediante la liberación de GnRH. La señalización de la Src mediante el sistema de la MAPK, ocurre en el contexto de complejo multiproteínico en el que el RP actúa como un andamio para reclutar una variedad de efectores enzimáticos. La activación del sistema Src-MAPK, resulta en un rápido y transitorio efecto membranar en los canales iónicos, en los receptores membranales y en efectos genómicos mediados a través de proteínas como como la proteína de unión a elementos en respuesta a AMPc (CREB) o con miembros de la familia de señales de transducción y activadores de la transcripción (STATs) modulando la actividad del ADN. Las flechas indican el sitio del efecto inhibitorio del PP2 sobre la acción de la Src.



como la PGE<sub>2</sub>, actúan sobre receptores membranales acoplados a proteína G, y posteriormente generan segundos mensajeros que activan proteínas cinasas, de este modo activan diversos procesos incluyendo la conducta de estro (Mani and Portillo, 2010). Similarmente, la EVC libera neurotransmisores (dopamina, norepinefrina, etc., Masters et al., 1993; Quysner and Blaustein, 2001) que actúan sobre receptores acoplados a proteína G (Etgen et al., 2001; Majewski and Musgrave, 1995; Neve et al., 2004). Evidencia obtenida en diversos sistemas celulares, sugiere que los receptores acoplados a proteína G, a través de la activación de cinasas, tales como la proteína cinasa A y C, pueden actuar sobre receptores a tirosina cinasas y el complejo Src-MAPK. (Lange, 2004; Lange et al., 1998; Migliaccio et al., 1998).

Los mecanismos a través de los cuales la vía de señalización de la Src-MAPK estimula la conducta de estro no son claros. En la figura 18 se muestran algunas de las acciones claramente establecidas del complejo RP-Src-MAPK que pueden estar relacionadas con la estimulación de la conducta de estro. El RP produce una activación rápida de la Src-MAPK (2-5 min) que disminuye a los 10 min (Boonyaratanakornkit et al., 2001; Migliaccio et al., 1998). Esta activación transitoria produce efectos no transcripcionales sobre canales iónicos, como aquellos asociados con receptores ionotrópicos a glutamato, a GABA y a acetilcolina (Charpantier et al., 2005; Choi et al., 2011; Groveman et al., 2012), así como a canales iónicos dependientes de voltaje (Endoh, 2005). Aunque estas vías alteran la excitabilidad neuronal, la posibilidad de que tales efectos rápidos y transitorios estén relacionados a la expresión de la conducta de estro es muy poco probable, porque la lordosis es desplegada muy raramente antes de los 60 min después de inyectar estos compuestos (la GnRH, la PGE<sub>2</sub> o las progestinas reducidas 5β). Sin embargo, es posible que estos eventos tempranos disparen cambios subsecuentes que mediaran el retraso en la expresión de la conducta de estro. La interacción RP-Src no solo media acciones no genómicas de la P, sino que también representa un mecanismo alternativo para la transcripción génica activada por el RP sin interactuar directamente con los genes en el núcleo. (Boonyaratanakornkit and Edwards, 2007; Boonyaratanakornkit et al., 2008; Leonhardt et al., 2003). En algunos casos, los efectos genómicos son el resultado de la interacción con moléculas intermediarias, como la proteína de unión a elementos en respuesta a AMPc (CREB) o con miembros de la familia de señales de transducción y activadores de la transcripción (STATs; Figura 18), cuyo resultado es la activación de la transcripción a través de los elementos de

respuesta al DNA, diferentes a aquellos elementos de respuesta activados por la unión de las progestinas al RP (Shi and Kehrl, 2004; Tung et al., 2011). Como se puede observar en la Figura 18, la vía de señalización del RP-Src-MAPK también puede modular al RP nuclear a través de la fosforilación de la serina 294, un proceso que incrementa la actividad transcripcional del RP, para su degradación subsecuente por el proteosoma 26S (Camacho-Arroyo et al., 2002; Faivre et al., 2005; Lange et al., 1998; Qiu and Lange, 2003). Aunque esto podría constituir un proceso a través del cual la GnRH, la PGE<sub>2</sub> o las progestinas 5 $\beta$  estimulan la conducta de lordosis, el hecho de que estos agentes no causen inhibición secuencial de la conducta de lordosis (González-Flores et al., 2004a; González-Mariscal et al., 1993), un proceso resultante de la fosforilación en la ser294 del RP, no apoya esta idea (Lange et al., 2000; Shen et al., 2001).

La conducta de estro en ratas ovx, como en casi todas las especies, puede ser estimulada por la administración de dosis repetidas de estrógenos (E<sub>2</sub>, estrona, estriol; Beyer y cols., 1982; Larsson y cols., 1976), aún en dosis bajas. En la rata *in vivo*, este proceso ocurre en el estro persistente, inducido por la edad o por iluminación continua (Takeo, 1984). Sin embargo, en ratas intactas bajo un ciclo estral normal, la conducta de estro es regulada por otras hormonas como la P. Esta condición puede replicarse en ratas ovx al administrar un pretratamiento con estrógeno, seguido al menos 20 horas después por la inyección de P. Los resultados del presente trabajo muestran que la infusión simultánea, del tamoxifen por vía icv, un inhibidor del RE, atenúa significativamente la conducta de lordosis y la proceptividad inducida por la mayoría de progestinas, la GnRH, la PGE<sub>2</sub> pero no por la VCS. Los resultados coinciden con reportes previos de Feder y Morin (1974) y Blaustein y cols. (1979) de que la administración de antiestrogenos cerca del tiempo de la inyección de la P puede evitar el efecto facilitatorio de la P sobre la lordosis en hembras de ratas ovx y ratas pretratadas con estrógeno. Este hallazgo sugiere la participación de los REs intracelulares sobre la conducta de estro facilitada por estos compuestos, varias horas después del pretratamiento con E<sub>2</sub> (Harlan y cols., 1983; Kow y Pfaff, 1975; Kow y Pfaff, 1998; Micevych y Sinchak, 2013; Micevych y Dewing, 2011) y sugiere que los REs intracelulares deben ser activados para facilitar el nivel máximo de despliegue de la conducta de estro. Previamente se ha mostrado que el RP es esencial para la expresión de la lordosis, ya que la antiprogestina RU486 inhibe el efecto facilitador de diversos agentes



diferentes a la P (pregnanos, GnRH, PGE<sub>2</sub>, leptina, dopamina, EVC; Beyer y cols., 1995; Mani y cols., 1996; Beyer y cols., 1997; García-Juárez y cols., 2011).

Los resultados de este trabajo son consistentes con el hecho de que durante el ciclo estral, los niveles de E<sub>2</sub> son muy altos, momento en que las ratas despliegan su conducta de estro (Powers, 1970; Zemlan and Adler, 1977). Así, en circunstancias normales, los REs probablemente son activados por E<sub>2</sub> endógeno alrededor del tiempo de la facilitación de la conducta de estro por la P. Éste puede ser el caso de las ratas ovx, ya que presentan niveles bajos de E<sub>2</sub> circulante después de la inyección sistémica de E<sub>2</sub>B, lo que induce la activación de niveles bajos de RE aún después de las 48 hrs (Schwartz y cols., 1979). Los niveles bajos de activación de los RE pueden ser suficientes para permitir la activación subsecuente por diferentes agentes como las progestinas, péptidos y PGE<sub>2</sub>. Esta idea es apoyada por el hecho de que el exifén bloqueó la conducta de lordosis inducida por la mayoría de los agentes usados en este trabajo, y porque el ICI también bloqueó la conducta de estro inducida por P y GnRH.

Particularmente, el tamoxifen no redujo significativamente la conducta de lordosis inducida por EVC. En ratas durante el ciclo estral y ovx-pretratadas hormonalmente, la EVC induce la liberación de diversos neurotransmisores y neuromoduladores (Master y cols., 1993) en áreas cerebrales que regulan varios procesos reproductivos (Etgen y Morales, 2002). Tales compuestos incluyen la GnRH y la PGE<sub>2</sub>, cuyos efectos conductuales fueron bloqueados por el tamoxifen. Así, la conducta de lordosis inducida por la EVC, puede ser facilitada a través de un mecanismo que no depende de la presencia de REs activados al tiempo en que la conducta sexual es facilitada por este estímulo. Por ejemplo, recientemente mostramos que la liberación endógena de norepinefrina, la cual actúa a través de la vía de los receptores  $\alpha 1$ -adrenérgicos, media la facilitación de la lordosis inducida por la EVC.

Esta observación coincide con un mecanismo que involucra la activación  $\alpha 1$ -adrenérgica de la vía del óxido nítrico/cGMP/proteína cinasa G (González-Flores y cols., 2007). Por lo cual, experimentos complementarios son necesarios para determinar si el tamoxifen bloquea la conducta de estro, inducida por norepinefrina u óxido nítrico. Sin embargo, la EVC puede activar eventualmente mecanismos de cascadas de señalización como las progestinas, péptidos y PGE<sub>2</sub> ya que el RU486 y varios inhibidores de cinasas pueden bloquear la facilitación de la



lordosis inducida por la EVC (Gómora-Arrati y cols., 2008; González-Flores y cols., 2008; Lima-Hernández 2012).

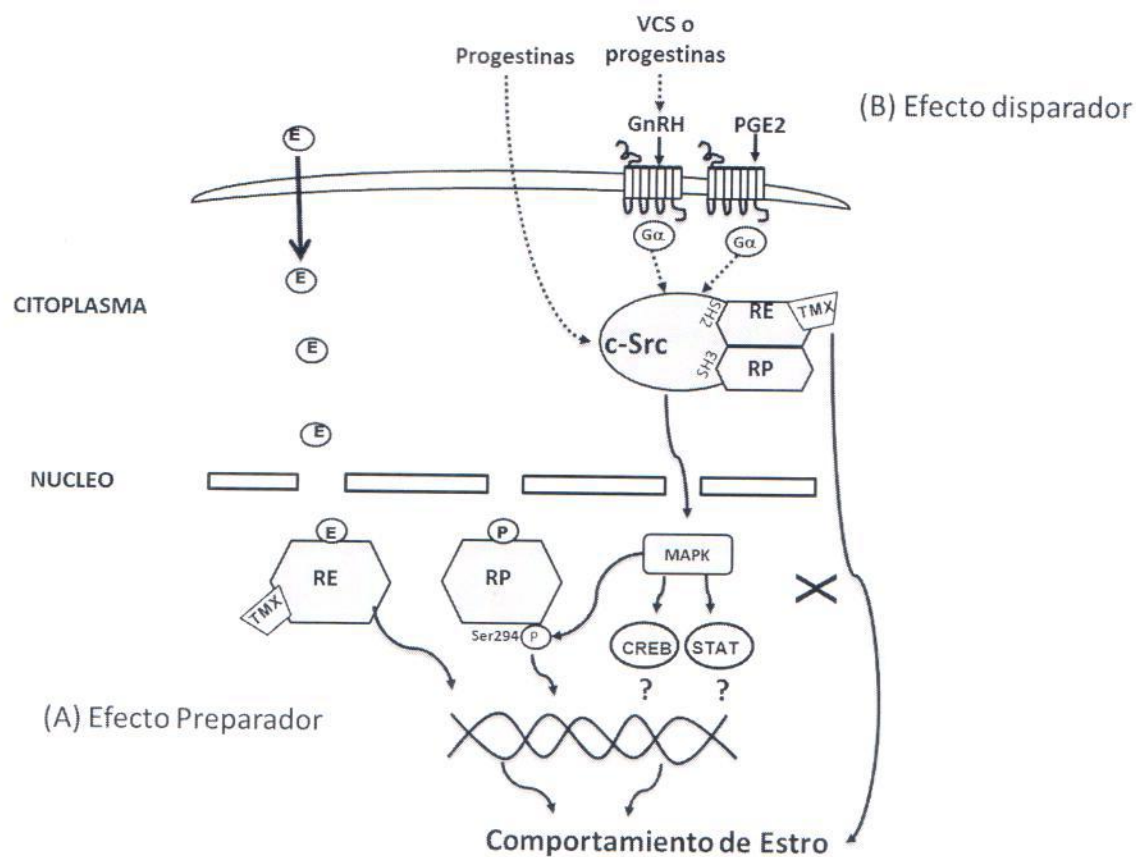
Los mecanismos a través de los cuales los REs estimulan la conducta de lordosis, en ratas pretratadas con estrógenos, por diversos agentes, como las progestinas, la GnRH, la leptina, la dopamina y la PGE<sub>2</sub> aún no son claros. La figura 19 ilustra algunas de las acciones bien establecidas del complejo RE-RP-Src-MAPK que pueden ser relacionadas con la estimulación de la conducta de estro. Aunque no se puede excluir la posibilidad de que los REs actúen sobre el genoma, activado típicamente por E<sub>2</sub>, son esenciales tanto para un estado temprano, como para uno tardío, de la respuesta conductual facilitada por cada uno de estos compuestos, por lo que sugerimos un mecanismo alternativo. Quizás el E<sub>2</sub> activa dos procesos controlados por los REs temporal y mecánicamente distintos (ver Fig 19). El primero es un efecto de pretratamiento en el cual el E<sub>2</sub> administrado a ratas ovx se une a los REs nucleares clásicos. Entonces el complejo hormona-receptor activa la maquinaria transcripcional asociada con el ADN, induciendo, de este modo, la síntesis de una variedad de proteínas como el RP (MacLusky y McEwen, 1978; Moguilewsky y Raynaud, 1979) y el RE (Castles y cols., 1997; Robertson y cols., 2002). El segundo es un efecto de disparo en el cual los REs y los RPs no ligados son activados por fosforilación y viajan rápidamente entre el núcleo y el citoplasma e interactúan con la tirosina cinasa Src. Se propone que los REs están asociados con la c-Src por la interacción de la fosfotirosina-537, ubicada en el dominio de unión al ligando del RE con el dominio SH2 de la Src, mientras que los RPs se unen a través de sus aminoácidos 421 y 428, ubicados en el extremo N-terminal, dominio SH3 de la Src, promoviendo la cascada de fosforilación de la Src-Raf-MAPK. La activación de este trímero, ej., RE-RP-Src, puede ocurrir por la unión de ligandos naturales como el E<sub>2</sub> o la P o por agentes no esteroideos (Boonyaratanakornkit y cols., 2008; Chen y cols., 2009; Chen y cols., 2010; Lima-Hernández y cols., 2012; Migliaccio y cols., 2007; Migliaccio y cols., 1998). Este trímero, se puede formar en algunas células que expresan tanto REs como RPs, incluyendo, presumiblemente a las neuronas que regulan la conducta de estro (Balleine y cols., 1999; Gréco y cols., 2001; Järvinen y cols., 2000).

Se han descrito interacciones físicas entre los REs y los RPs que ocurren en el citoplasma (Ballare y cols., 2003; Boonyaratanakornkit y cols., 2001; Hagan y cols., 2009; Migliaccio y cols., 1998). Hormonas disparadoras de la conducta de estro como la P, la GnRH, la PGE<sub>2</sub>, etc.,

podrían activar la vía de la Src-MAPK asociada con el dímero RE-RP, induciendo rápidamente la conducta de estro por la vía de un mecanismo no genómico. Esta idea es apoyada por resultados obtenidos en nuestro laboratorio, en los cuales la antiprogestina, RU486, así como los inhibidores de la MAPK y la Src (PD98059 y el PP2 respectivamente) inhibieron la conducta de lordosis y la proceptividad inducidas por compuestos con diversas estructuras químicas, dentro de las que se incluyen: progestinas reducidas en el anillo A, la GnRH y la PGE<sub>2</sub>, así como por la EVC en el modelo de la rata ovx-pretratada con E<sub>2</sub> (Beyer y cols., 1995; Beyer y cols., 1997; Etgen y González-Flores y cols., 2010; González-Flores y cols., 2008; González-Flores y cols., 2009; González-Flores y cols., 2004; Lima-Hernández y cols., 2012).

Experimentos donde se usan compuestos antiestrogénicos apoyan este modelo; de este modo el tamoxifen y el ICI, administrados al momento del pretratamiento, reducen la conducta de lordosis inducida por la P (Etgen, 1979; Etgen y Shamamian, 1986). Resultados similares fueron obtenidos cuando los antiestrogenos se administraron junto con la P (Blaustein y Feder, 1979). En células cancerígenas T47D, la activación de la MAPK por una progestina sintética fue bloqueada después del tratamiento con antiestrógenos. Migliaccio y cols. (1998), propusieron que los REs son requeridos para la interacción de los RPs con la c-Src, así como la activación subsecuente de la MAPK. Además, la conducta de lordosis inducida por varios agentes, tales como las progestinas y la PGE<sub>2</sub>, podría ser inducida indirectamente a través de la liberación hipotalámica de la GnRH, sin activar a los REs, pero modulando receptores membranales, los subtipos GnRH-1. Estos receptores activan la proteína Gas para estimular la formación de AMPc y así inducir la conducta de lordosis (Beyer y cols., 1982; Fernández-Guasti y cols., 1983; Whalen y Lauber, 1986) o pueden activar la cascada de la Src-MAPK (Shah et al., 2003). En apoyo a esta idea, mostramos que la conducta de estro inducida por progestinas reducidas en el anillo A y VCS fue inhibida por el antagonista del receptor GnRH-1, el antide (Gómora-Arrati et al., 2008).





**Figura 19.** Diagrama del posible mecanismo de acción mediante el cual las progestinas, GnRH y PGE<sub>2</sub> activan el Sistema RE–Src para inducir la conducta de estro en ratas ovx, pretratadas con E<sub>2</sub>. (A) Efecto preparador: el E<sub>2</sub>, mediante su unión al RE induce efectos genómicos (lado izquierdo inferior). (B) Efecto disparador: progestinas reducidas en el anillo A, GnRH, y PGE<sub>2</sub> actúan sobre un receptor de membrana para activar cinasas serina/treonina reguladas por segundos mensajeros. La señalización de la Src, mediante el sistema MAPK ocurre en el contexto de un complejo multiprotéico, en el que el RE y el RP actúan como un andamio para reclutar una variedad de efectores enzimáticos. La activación del sistema de Src–MAPK resulta en un rápido y transitorio efecto membranar así como un tardío efecto genómico mediado a través de proteínas como CREB o STATs, que modulan la transcripción génica. Tanto el efecto de priming y el disparador del RE pueden ser inhibidos por tamoxifen y el ICI.



## 9. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo indican que la Src juega un papel esencial en la facilitación de la conducta de estro en ratas pretratadas con benzoato de estradiol no solo por progestinas, sino que por una variedad de agentes con estructuras químicas diversas.

Además, de la participación del RE en la regulación del comportamiento de estro facilitado por diversos compuestos, con estructuras químicas diferentes, muchas horas después del efecto preparador por la inyección de estrógenos.

Por lo cual nosotros proponemos que la interacción entre diferentes moléculas (RE,RP,Src,MAPK) en el citoplasma celular puede tener un papel importante para la integración de estímulos externos e internos que facilitan y controlan la conducta sexual femenina.

## 10. PERSPECTIVAS

La acción que ejerce la Src como un posible componente de un complejo con el RP-B, el isómero del RP con una longitud completa. Nos permite pensar en el diseño de estudios complementarios al presente trabajo enfocados a determinar si otras vías de señalización intracelular participan utilizan éste complejo, con el fin de determinar si la activación de la Src por agentes sin afinidad por el RP es mediada por el RP, como en el caso en el que el RP está unido con su ligando, o si el RP sirve solo como anclaje para la Src, permitiendo el reclutamiento de efectores enzimáticos capaces de modular la actividad de la Src.

Sin embargo, se requiere de estudios complementarios para determinar si los efectos de disparo mediados por la activación del RE, a través de agentes sin afinidad por el mismo RE, son mediados a través de esta vía alternativa.

## 11. REFERENCIAS

- Abram CL y Courtneidge SA. 2000. Src family tyrosine kinases and growth factor signaling. *Experimental cell research*, 254(1), 1-13.
- Agmo A, Soria P y Paredes R. 1989. Gabaergic drugs and lordosis behavior in the female rat. *Hormones and behavior* 23: 368-389.
- Ahdieh HB, Brown TJ, Wade GN y Blaustein JD. 1986. Hypothalamic nuclear progesterin receptor and the duration of sexual receptivity in ovariectomized and ovariectomized-hysterectomized rats. *Physiol Behav* 36: 211-215.
- Andrew ER. 1971. The narrowing of NMR spectra of solids by high-speed specimen rotation and the resolution of chemical shift and spin multiplet structures for solids. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 8(1), 1-39.
- Apostolakis EM, Garai J, Clark JH y O'Malley BW. 1996. In vivo regulation of central nervous system progesterone receptors: cocaine induces steroid-dependent behavior through dopamine transporter modulation of D5 receptors in rats. *Molecular Endocrinology*, 10(12), 1595-1604.
- Aronica SM y Katzenellenbogen BS. 1991. Progesterone Receptor Regulation in Uterine Cells: Stimulation by Estrogen, Cyclic Adenosine 3', 5'-Monophosphate, and Insulin-Like Growth Factor I and Suppression by Antiestrogens and Protein Kinase Inhibitors\*. *Endocrinology*, 128(4), 2045-2052.
- Ballare C, Uhrig M, Bechtold T, Sancho E, Di Domenico M, Migliaccio A, Auricchio F y Beato M. 2003. Two domains of the progesterone receptor interact with the estrogen receptor and are required for progesterone activation of the c-Src/Erk pathway in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 23: 1994-2008.
- Balleine RL, Hunt SM y Clarke CL. 1999. Coexpression of alternatively spliced estrogen and progesterone receptor transcripts in human breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 1370-1377.
- Barfield RJ, Glaser JH, Rubin BS y Etgen AM. 1984. Behavioral effects of progesterin in the brain. *Psychoneuroendocrinology*, 9(3), 217-231
- Beach FA. 1942. Importance of progesterone to induction of sexual receptivity in spayed female rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 51: 369-371.
- Beach FA. 1976. Sexual attractivity, proceptivity and receptivity in female mammals. *Horm Behav* 2: 105-138.



- Beato M, Herrlich P y Schütz G. 1995. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell*, 83(6), 851-857.
- Beato M y Sánchez-Pacheco A. 1996. Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocrine Rev* 17: 587-609.
- Beyer C, Canchola E y Larsson K. 1981. Facilitation of lordosis behavior in the ovariectomized estrogen primed rat by dibutyryl cAMP. *Physiology & behavior*, 26(2), 249-251.
- Beyer C, Gomora P, Canchola E y Sandoval Y. 1982b. Pharmacological evidence that LH-RH action on lordosis behavior is mediated through a rise in cAMP. *Horm Behav* 16: 107-112.
- Beyer C, González-Flores O, García-Juárez M y González-Mariscal G. 2003. Non-ligand activation of estrous behavior in rodents: cross-talk at the progesterone receptor. *Scand J Psychol* 3: 221-229.
- Beyer C, González-Flores O y González-Mariscal G. 1995. Ring A reduced progestins potently stimulate estrous behavior in rats: paradoxical effect through the progesterone receptor. *Physiol Behav* 58: 985-993.
- Beyer C, González-Flores O y González-Mariscal G. 1997. Progesterone receptor participates in the stimulatory effect of LHRH, prostaglandin E<sub>2</sub> and cyclic AMP on lordosis and proceptive behavior in rats. *J Neuroendocrinol* 9: 609-614.
- Beyer C y González-Mariscal G. 1986. Elevation in hypothalamic cyclic AMP as a common factor in the facilitation of lordosis in rodents: a working hypothesis. *Ann N Y Acad Sci* 474: 270-281.
- Beyer C y González-Mariscal G. 1991. Effects of progesterone and natural progestins in brain. En: *Reproduction, growth and development*. Negro Vilar A Pérez-Palacios G (eds.) Raven Press New York. pp. 199-208.
- Beyer C, González-Mariscal G, Eguíbar JR y Gómora P. 1989. Lordosis facilitation in estrogen-primed rats by intrabrain injection of pregnanes. *Pharmacol Biochem Behav* 31: 919-926.
- Blandau RJ, Boling JL y Young WC. 1941. The length of heat in the albino rat as determined by the copulatory response. *The Anatomical Record*, 79(4), 453-463.
- Blaustein JD. 2003. Progestin receptors: neuronal integrators of hormonal and environmental stimulation. *Ann N Y Acad Sci* 1007: 238-250.
- Blaustein JD y Feder HH. 1979. Cytoplasmic progestin receptors in female guinea pigs brain and their relationship to refractorines in expression of female sexual behavior. *Brain Res* 177: 489-498.

- Blaustein JD y Feder HH. 1979. Cytoplasmic progesterin receptors in guinea pig brain: characteristics and relationship to the induction of sexual behavior. *Brain Res* 169: 481-497.
- Boling JL y Blandau R. 1939. The estrogen-progesterone induction of mating responses in the spayed female rats. *Endocrinol* 25: 359-364.
- Boonyaratanakornkit V, Bi Y, Rudd M y Edwards DP. 2008. The role and mechanism of progesterone receptor activation of extra-nuclear signaling pathways in regulating gene transcription and cell cycle progression. *Steroids* 73: 922-928.
- Boonyaratanakornkit V y Edwards DA. 2007. Receptor mechanisms mediating nongenomic actions of sex steroids. *Semin Reprod Med* 25: 139-153.
- Boonyaratanakornkit V, Scott M, Ribon V, Sherman L, Anderson S, Maller J, Miller W y Edwards DA. 2001. Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinase. *Mol Cell* 8: 269-280.
- Brann DW, Dhandapani K, Wakade C, Mahesh VB y Khan MM. 2007. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications. *Steroids*, 72(5), 381-405.
- Brookhart JM, Dey FL y Ranson SW. 1941. The abolition of mating behavior by hypothalamic lesions in guinea pigs. *Endocrinology* 28: 561-565.
- Brugge JS y Erikson RL. 1977. Identification of a transformation-specific antigen induced by an avian sarcoma virus. *Nature*, 269(5626), 346-348.
- Brown MT y Cooper JA. 1996. Regulation, substrates and functions of src. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1287(2), 121-149.
- Brown CG y Poyser NL. 1984. Studies on ovarian prostaglandin production in relation to ovulation in the rat. *Journal of reproduction and fertility*, 72(2), 407-414.
- Butcher RL, Collins WE y Fugo NW. 1974. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 $\beta$  throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology*, 94(6), 1704-1708.
- Caldwell JD, Prange AJ y Pedersen CA. 1986. Oxytocin facilitates the sexual receptivity of estrogen-treated female rats. *Neuropeptides* 7: 175-189.
- Camacho-Arroyo I, Pérez-Palacios G, Pasapera AM y Cerbón MA. 1994. Intracellular progesterone receptors are differentially regulated by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *Steroid Biochem Molec Biol* 50: 299-303.



- Camacho-Arroyo I, González-Arenas A, González-Agüero G, Guerra-Araiza C y González-Morán G. 2003. Changes in the content of progesterone receptor isoforms and estrogen receptor alpha in the chick brain during embryonic development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 136(2), 447-452.
- Camacho-Arroyo I, Villamar-Cruz O, González-Arenas A y Guerra-Araiza C. 2002. Participation of 26S proteasome in the regulation of progesterone receptor concentrations in the rat brain. *Neuroendocrinology* 76: 267-271.
- Carr WJ, Loeb LS y Wylie NR. 1966. Responses to feminine odors in normal and castrated male rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 62(2), 336
- Castoria G, Barone MV, Di Domenico M, Bilancio A, Ametrano D, Migliaccio A y Auricchio F. 1999. Non-transcriptional action of oestradiol and progestin triggers DNA synthesis. *The EMBO journal*, 18(9), 2500-2510.
- Castoria G, Migliaccio A, Bilancio A, Di Domenico M, de Falco A, Lombardi M y Auricchio F. 2001. PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *The EMBO journal*, 20 (21), 6050-6059.
- Castoria R, Caputo L, De Curtis F y De Cicco V. 2003. Resistance of postharvest biocontrol yeasts to oxidative stress: a possible new mechanism of action. *Phytopathology*, 93(5), 564-572.
- Celotti F, Melcangi RC y Martini L. 1992. The 5 alpha-reductase in the brain: molecular aspects and relation to brain function. *Frontiers in neuroendocrinology*, 13(2), 163-215.
- Cenni B y Picard D. 1999. Ligand-independent activation of steroid receptors: new roles for old players. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 10(2), 41-46.
- Chan A, Dudley CA y Moss RL. 1983. Action of prolactin, dopamine and LHRH on ventromedial hypothalamic neurons as a function of ovarian hormones. *Neuroendocrinology* 36: 397-403.
- Charpantier E, Wiesner A, Huh KH, Ogier R, Hoda JC, Allaman G, Raggenbass M, Feuerbach D, Bertrand D y Fuhrer C. 2005. Alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptors are negatively regulated by tyrosine phosphorylation and Src-family kinases. *J Neurosci* 25: 9836-9849.
- Cheng YJ y Karabolos HJ. 1973. Conversion of Progesterone to 5  $\alpha$  -Pregnane-3, 20-dione and 3  $\alpha$  -Hydroxy-5  $\alpha$  -pregnan-20-one by Rat Medial Basal Hypothalami and the Effects of Estradiol and Stage of Estrous Cycle on the Conversion\*. *Endocrinology*, 93(5), 1157-1162.



- Chen J, An BS, Cheng L, Hammond GL y Leung PC. 2009. Gonadotropin-releasing hormone-mediated phosphorylation of estrogen receptor- $\alpha$  contributes to fosB expression in mouse gonadotrophs. *Endocrinology* 150: 4583–4593.
- Chen J, An BS, So WK, Cheng L, Hammond GL y Leung PC. 2010. Gonadotropin-releasing hormone-I-mediated activation of progesterone receptor contributes to gonadotropin  $\alpha$ -subunit expression in mouse gonadotrophs. *Endocrinology* 151: 1204–1211.
- Choi UB, Xiao S, Wollmuth LP y Bowen ME. 2011. Effect of Src kinase phosphorylation on disordered C-terminal domain of N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor subunit GluN2B protein. *J Biol Chem* 286: 29904–29912.
- Chu HP y Etgen AM. 1999. A potential role of cyclic GMP in the regulation of lordosis behavior of female rats. *Horm Behav* 32: 125-132.
- Clemens LG y Weaver DR. 1985. The role of gonadal hormones in the action of feminine sexual behavior. En: *Handbook of behavioral neuroendocrinology*. Adler N Pfaff D Goy RW (eds.) Plenum Press New York and London. pp. 1833-1858.
- Conn PM, Chafouleas JG, Rogers D y Means AR. 1981. Gonadotropin releasing hormone stimulates calmodulin redistribution in rat pituitary. 264-265.
- Cover PO y Buckingham JC. 1989. Effects of selective opioid-receptor blockade on the hypothalamo-pituitary-adrenocortical responses to surgical trauma in the rat. *Journal of endocrinology*, 121(2), 213-220.
- Cueva-Rolón R, Sansone G, Bianca R, Gómez LE, Beyer C, Whipple B y Komisaruk BR. 1996. Vagotomy blocks responses to vaginocervical stimulation after genitospinal neurectomy in rats. *Physiology & behavior*, 60(1), 19-24.
- Davis RJ. 1993. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 14553-14553.
- DeBold JF y Malsbury CW. 1989. Facilitation of sexual receptivity by hypothalamic and midbrain implants of progesterone in female hamsters. *Physiol Behav* 46: 655-660.
- Dey FL, Lenninger CR y Ranson SW. 1942. The effects of hypothalamic lesions on mating behavior in female guinea pigs. *Endocrinology* 30: 323-326.
- Diakow C. 1975. Motion picture analysis of rat mating behavior. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 88(2), 704.
- Dluzen DE y Mickley KR. 2005. Gender differences in modulatory effects of tamoxifen upon the nigrostriatal dopaminergic system. *Pharmacol Biochem Behav* 80: 27–33.

Dohanich GP, Barr PJ, Witcher JA y Clemens LG. 1984. Pharmacological and anatomical aspects of cholinergic activation of female sexual behavior. *Physiology & behavior*, 32(6), 1021-1026.

Dudley CA y Moss RL. 1976. Facilitation of lordosis in the rat by prostaglandin E2. *J Endocrinol* 71: 457-458.

Dudley CA, Vale W, Rivier J y Moss RL. 1983. Facilitation of sexual receptivity in the female rat by a fragment of the LHRH decapeptide, Ac-LHRH. *Neuroendocrinology* 36: 486-488.

Edwards DP. 2005. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol* 67: 335-376.

Edwards DP, Whalen RE y Nadler RD. 1968. Induction of estrus: estrogen-progesterone interactions. *Physiol Behav* 3: 29-33.

Ellerman V y Bang O. 1908. Experimentelle leukemia ben hutinern. *Zentralbl Bakterial*, 46, 595-609.

Endoh T. 2005. Involvement of Src tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase in the facilitation of calcium channels in rat nucleus of the tractus solitarius by angiotensin II. *J Physiol* 568: 851-865.

Erskine MS. 1989. Solicitation behavior in the estrous female rat: a review. *Horm Behav* 23: 473-502.

Eskay RL, Eskay J, Mical RS y Porter JC. 1975. Prostaglandin E2-Induced Release of LHRH into Hypophysial Portal Blood 1. *Endocrinology*, 97(4), 816-824.

Etgen AM. 1979. Antiestrogens: effects of tamoxifen, nafoxidine, and CI-628 on sexual behavior, cytoplasmic receptors, and nuclear binding of estrogen. *Horm Behav* 13: 97-112.

Etgen AM. 1984. Progestin receptor and the activation of female reproductive behavior: a critical review. *Horm Behav* 18: 411-430.

Etgen AM. 2003. Ovarian steroid and growth factor regulation of female reproductive function involves modification of hypothalamic alpha 1-adrenoceptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* 1007: 153-161.

Etgen AM y Acosta-Martínez M. 2003. Participation of growth factor signal transduction pathways in estradiol-facilitation of female reproductive behavior. *Endocrinology* 144: 3828-3835.



Etgen AM, Ansonoff MA y Quesada A. 2001. Mechanisms of ovarian steroid regulation of norepinephrine receptor-mediated signal transduction in the hypothalamus: implications for female reproductive physiology. *Horm Behav* 40: 169–177.

Etgen AM y Barfield RJ. 1986. Antagonism of female sexual behavior with intracerebral implants of antiprogestin RU 38486: correlation with binding to neural progestin receptors. *Endocrinology* 119: 1610-1617.

Etgen AM y Morales JC. 2002. Somatosensory stimuli evoke norepinephrine release in the anterior ventromedial hypothalamus of sexually receptive female rats. *J Neuroendocrinol* 14: 213–218.

Etgen AM y Shamamian P. 1986. Regulation of estrogen-stimulated lordosis behavior and hypothalamic progestin receptor induction by antiestrogens in female rats. *Horm Behav* 20: 166–180.

Evans JR. 1988. Acclimation by the thylakoid membranes to growth irradiance and the partitioning of nitrogen between soluble and thylakoid proteins. *Functional Plant Biology*, 15(2), 93-106.

Faivre E, Skildum A, Pierson-Mullany L y Lange CA. 2005. Integration of progesterone receptor mediated rapid signaling and nuclear actions in breast cancer cell models: role of mto-gen-activated protein kinases and cell cycle regulators. *Steroids* 70: 418–426.

Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, y Wehling M. 2000. Multiple actions of steroid hormones—a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacological reviews*, 52(4), 513-556.

Fawell S, White R, Hoare S, Sideham M, Page M y Parker M. 1990. Inhibition of estrogen receptor-DNA binding by the pure antiestrogen ICI 164 384 appears to be mediated by impaired receptor dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87:6883-6887.

Feder HH y Morin LP. 1974. Suppression of lordosis in guinea pigs by ethamoxytriphétel (MER-25) given at long intervals (34–46 hr) after estradiol benzoate treatment. *Horm Behav* 5: 63–71.

Fernández-Guasti A, Larsson K y Beyer C. 1985. Potentiative action of a and b adrenergic receptor stimulation in inducing lordosis behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 22: 613-617.

Fernández-Guasti A, Rodríguez-Manzo G y Beyer C. 1983. Effect of guanine derivatives on lordosis behavior in estrogen primed rats. *Physiol Behav* 31: 589-592.



- Foreman MM y Moss RL. 1977. Effects of subcutaneous injection and intrahypothalamic infusion of releasing hormones upon lordotic response to repetitive coital stimulation. *Hormones and behavior*, 8(2), 219-234.
- Fraser HM. 1979. Releasing hormones. En: *Reproduction in mammals of hormone action*. Austin CRS RV (eds.) Cambridge Univ. Press London/New York Cambridge. pp. 1-54.
- Freedman RR y Woodward S. 1992. Behavioral treatment of menopausal hot flushes: evaluation by ambulatory monitoring. *American journal of obstetrics and gynecology*, 167(2), 436-439.
- Freeman ME. 1994. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: *The physiology of reproduction*. Knobil E Neill JD (eds.) Raven Press New York. pp. 613-658.
- Frye CA y DeBold JF. 1993. 3 a-OH-DHP and 5 a-THDOC implants to the ventral tegmental area facilitate sexual receptivity in hamsters after progesterone priming to the ventral medial hypothalamus. *Brain Res* 612: 130-137.
- Frye CA y Walf AA. 2008. Progesterone enhances performance of aged mice in cortical or hippocampal tasks. *Neuroscience letters*, 437(2), 116-120.
- Frye CA y Walf AA. 2008. Progesterone to ovariectomized mice enhances cognitive performance in the spontaneous alternation, object recognition, but not placement, water maze, and contextual and cued conditioned fear tasks. *Neurobiology of learning and memory*, 90(1), 171-177.
- Fujinami A y Inamoto K. 1914. *Z. Krebsforsch.* 14, 94-119.
- García-Juárez M, Beyer C, Soto-Sánchez A, Domínguez-Ordoñez R, Gómora-Arrati P, Lima-Hernández FJ, Eguibar JR, Etgen AM y González-Flores O. 2011. Leptin facilitates lordosis behavior through GnRH-1 and progestin receptors in estrogen-primed rats. *Neuropeptides* 45: 63-67.
- Gee JM, Robertson JF, Ellis IO, Nicholson R I y Hurst HC. 1999. Immunohistochemical analysis reveals a tumour suppressor - like role for the transcription factor AP - 2 in invasive breast cancer. *The Journal of pathology*, 189(4), 514-520
- Gibson M, Nemmas L, Beckman W. 1991. The mechanism of ICI 164 384 antiestrogenicity involves rapid loss of estrogen receptor in uterine tissue. *Endocrinology*. 129:2000-2010.
- Gómora-Arrati P, Beyer C, Lima-Hernández FJ, Gracia ME, Etgen AM y GonzálezFlores O. 2008. GnRH mediates estrous behavior induced by ring A reduced progestins and vaginocervical stimulation. *Behav Brain Res* 187: 1-8.

González-Flores O, Beyer C, Gómora-Arrati P, García-Juárez M, Lima-Hernández FJ, Soto-Sánchez A y Etgen AM. 2010. A role for Src kinase in progestin facilitation of estrous behavior in estradiol-primed female rats. *Horm Behav* 58: 223–229.

González-Flores O, Beyer C, Lima-Hernández FJ, Gómora-Arrati P, Gómez-Camarillo MA, Hoffman K y Etgen AM. 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: 237–243.

González-Flores O y Etgen AM. 2004. The nitric oxide pathway participates in estrous behavior induced by progesterone and some of its ring A-reduced metabolites. *Hormones and behavior*, 45(1), 50-57.

González-Flores O, Etgen AM, Komisaruk BK, Gómora-Arrati P, Macias-Jiménez A, Lima-Hernández FJ, García-Juárez M y Beyer C. 2008. Antagonists of the protein kinase A and mitogen-activated protein kinase systems and of the progestin receptor block the ability of vaginocervical/flank-perineal stimulation to induce female rat sexual behaviour. *J Neuroendocrinol* 20: 1361–1367.

González-Flores O, Gómora-Arrati P, García-Juárez M, Gómez-Camarillo MA, Lima-Hernández FJ, Beyer C y Etgen AM. 2009. Nitric oxide and ERK/MAPK mediation of estrous behavior induced by GnRH, PGE<sub>2</sub> and db-cAMP in rats. *Physiol Behav* 96: 606–612.

González-Flores O, Guerra-Araiza C, Cerbón M, Camacho-Arroyo I y Etgen AM. 2004a. The 26S proteasome participates in the sequential inhibition of estrous behavior induced by progesterone in rats. *Endocrinology* 145: 2328–2336.

González-Flores O, Ramírez-Orduña JM, Lima-Hernández FJ, García-Juárez M y Beyer C. 2006. Differential effect of kinase A and C blockers on lordosis facilitation by progesterone and its metabolites in ovariectomized estrogen-primed rats. *Horm Behav* 49: 398–404.

González-Flores O, Shu J, Camacho-Arroyo I y Etgen AM. 2004b. Regulation of lordosis by cyclic 3',5'-guanosine monophosphate, progesterone, and its 5alpha-reduced metabolites involves mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 145: 5560–5567.

Gonzalez-Mariscal G y Beyer C. 1989. Blockade of LHRH-induced lordosis by alpha- and beta-adrenergic antagonists in ovariectomized, estrogen primed rats. *Pharmacol Biochem Behav* 31: 573-577.

González-Mariscal G, González-Flores O y Beyer C. 1989. Intrahypothalamic injection of RU486 antagonizes the lordosis induced by ring A-reduced progestins. *Physiol Behav* 46: 435-438.



- González-Mariscal G, Melo AI y Beyer C. 1993. Progesterone but not LHRH or prostaglandin E2, induces sequential inhibition of lordosis to various lordogenic agents. *Neuroendocrinol* 57: 940-945.
- Gorospe WC y Freeman ME. 1981. An Ovarian Role in Prolonging and Terminating the Two Surges of Prolactin in Pseudopregnant Rats\*. *Endocrinology*, 108(4), 1293-1298.
- Gréco B, Allegretto EA, Tetel MJ y Blaustein JD. 2001. Coexpression of ER beta with ER alpha and progesterin receptor proteins in the female rat forebrain: effects of estradiol treatment. *Endocrinology* 142: 5172-5181.
- Groveman BR, Feng S, Fang XQ, Pflueger M, Lin SX, Bienkiewicz EA y Yu X. 2012. The regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by Src kinase. *FEBS J* 279: 20-28.
- Gunnet JW y Freeman ME. 1983. The Mating-induced Release of Prolactin: A Unique Neuroendocrine Response\*. *Endocrine reviews*, 4(1), 44-61.
- Hagan CR, Faivre EJ y Lange CA. 2009. Scaffolding actions of membrane-associated progesterone receptors. *Steroids* 74: 568-572.
- Hall NR y Luttge WG. 1977. Diencephalic sites responsive to prostaglandin E2 facilitation of sexual receptivity in estrogen-primed ovariectomized rats. *Brain Res Bull* 2: 203-207.
- Hall NR y Luttge WG. 1978. Effects of the prostaglandin synthesis inhibitor, indomethacin on estrogen-and estrogen plus progesterone-induced sexual receptivity in ovariectomized rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 8(5), 619-621.
- Hanke JH, Gardner JP, Dow RL, Changelian PS, Brissette WH, Weringer EJ, Pollok BA y Connelly PA. 1996. Discovery of a novel, potent, and Src familyselective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem* 271: 695-701.
- Hardy DF y DeBold JF. 1972a. Effects of coital stimulation upon behavior of the female rat. *J Comp Physiol Psychol* 78: 400-408.
- Hardy DF y DeBold JF. 1972b. The relationship between levels of exogenous hormones and the display of lordosis by the female rat. *Horm Behav* 2: 287-297.
- Harlan RE y Pfaff DW. 1983. Midbrain microinfusions of prolactin increase the estrogen-dependent behavior lordosis. *Science* 219: 1451-1453.
- Harlan RE, Shivers BD, Kow LM y Pfaff DW. 1983. Estrogenic maintenance of lordotic responsiveness: requirement for hypothalamic action potentials. *Brain Res* 268: 67-78.



Hedden A, Muller W, Jensen E. 1995. A new interpretation of estrogen action. *Ann N Y Acad Sci* 761:109-120.

Hennessey AC, Camak L, Gordon F y Edwards DA. 1990. Connections between the pontine central gray and the ventromedial hypothalamus are essential for lordosis in female rats. *Behav Neurosci* 104: 477-488.

Herbison AE y Pape JR. 2001. New evidence for estrogen receptors in gonadotropin releasing hormone neurons. *Frontiers in neuroendocrinology*, 22(4), 292-308.

Hunter T y Sefton BM. 1980. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(3), 1311-1315.

Järvinen TA, Pelto-Huikko M, Holli K y Isola J. 2000. Estrogen receptor beta is coexpressed with ERalpha and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation rate in breast cancer. *Am J Pathol* 156: 29-35.

Jensen EV y Jacobson HI. 1962. Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Prog Horm Res*, 18(4), 387.

Karavolas HJ y Hodges DR. 1990. Neuroendocrine metabolism of progesterone and related progestins. *Steroids and neuronal activity*, 153, 22-55.

Karavolas HJ, Bertics PJ, Hodges D y Rudie N. 1984. Progesterone processing by neuroendocrine structures. *Metabolism of Hormonal Steroids in the Neuroendocrine Structures*, 13, 149-170.

Kato J y Onouchi T. 1977. Specific Progesterone Receptors in the Hypothalamus and Anterior Hypophysis of the Rat\*. *Endocrinology*, 101(3), 920-928.

Katzenellenbogen JA, Carlson KE, Johnson Jr HJ y Myers HN. 1977. Estrogen photoaffinity labels. 2. Reversible binding and covalent attachment of photosensitive hexestrol derivatives to the uterine estrogen receptor. *Biochemistry*, 16(9), 1970-1976.

Klein-Hitpaß L, Schorpp M, Wagner U y Ryffel GU. 1986. An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells. *Cell*, 46(7), 1053-1061.

Klein-Hitpass L, Tsai SY, Weigwl NL, Allan GF, Riley D, Rodriguez R, Schrader WT, Tsai M y O'Malley BW. 1990. The progesterone receptor stimulates cell-free transcription by enhancing the formation of a stable preinitiation complex. *Cell* 60:247-257.

- Kmieciak TE y Shalloway D. 1987. Activation and suppression of pp60<sup>c-src</sup> transforming ability by mutation of its primary sites of tyrosine phosphorylation. *Cell*, 49(1), 65-73.
- Koide Y, Morikawa S, Mabuchi Y, Muguruma Y, Hiratsu E, Hasegawa K, y Matsuzaki Y. 2007. Two distinct stem cell lineages in murine bone marrow. *Stem Cells*, 25(5), 1213-1221.
- Komisaruk BR, Bianca R, Sansone G, Beyer C y Whipple B. 1996. Brain-mediated responses to vaginocervical stimulation in spinal cord-transected rats: role of the vagus nerves. *Brain Research*, 708(1), 128-134.
- Komisaruk BR y Larsson K. 1971. Suppression of a spinal and a cranial nerve reflex by vaginal or rectal probing in rats. *Brain Research*, 35(1), 231-235.
- Kow LM, Mobbs CV y Pfaff DW. 1994. Roles of second-messenger systems and neuronal activity in the regulation of lordosis by neurotransmitters, neuropeptides, and estrogen: a review. *Neurosci Biobehav Rev* 18:251-268.
- Kow LM y Pfaff D. 1975. Dorsal root recording relevant for mating reflexes female rats: identification of receptive fields and effects of peripheral denervation. *J Neurobiol* 5:23-37.
- Kow LM y Pfaff DW. 1998. Mapping of neural and signal transduction pathways for lordosis in the search for estrogen actions on the central nervous system. *Behav Brain Res* 92:169-180.
- Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S y Gustafsson JA. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(12), 5925-5930.
- Kurzrok R y Lieb CC. 1930. Biochemical Studies of Human Semen. II. The Action of Semen on the Human Uterus. *Experimental Biology and Medicine*, 28(3), 268-272.
- Lange CA. 2004. Making sense of cross-talk between steroid hormone receptors and intracellular signaling pathways: who will have the last word? *Mol Endocrinol* 18:269-278.
- Lange CA, Richer JK, Shen T y Horwitz KB. 1998. Convergence of progesterone and epidermal growth factor signaling in breast cancer. Potentiation of mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 273:31317-31326.
- Lange CA, Shen T y Horwitz KB. 2000. Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26s proteasome. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 97: 1032-1037.



- Larsson K, Södersten P, Beyer C, Morali G y Pérez-Palacios G. 1976. Effects of estrone, estradiol and estriol combined with dihydrotestosterone on mounting and lordosis behavior in castrated male rats. *Horm Behav* 7:379-390.
- Law T y Meagher W. 1958. Hypothalamic lesions and sexual behavior in the female rats. *Science* 128:1626-1627.
- Leonhardt S, Boonyaratanakornkit V y Edwards DA. 2003. Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms. *Steroids* 68:761-770.
- Leung PC y Wang J. 1989. The role of inositol lipid metabolism in the ovary. *Biol Reprod* 40:703-708.
- Lieberman H. 1997. Autonomous interface agents. In *Proceedings of the ACM SIGCHI Conference on Human factors in computing systems* (pp. 67-74). ACM.
- Lima-Hernández FJ, Beyer C, Gómora-Arrati P, García-Juárez M, Encarnación-Sánchez JL, Etgen AM y González-Flores O. 2012. Src kinase signaling mediates estrous behavior induced by  $5\beta$ -reduced progestins, GnRH, prostaglandin E2 and vaginocervical stimulation in estrogen-primed rats. *Horm Behav* 62:579-584.
- Li Z, Hosoi Y, Cai K, Tanno Y, Matsumoto Y, Enomoto A, Morita A, Nakagawa K y Miyagawa K. 2006. Src tyrosine kinase inhibitor PP2 suppresses ERK1/2 activation and epidermal growth factor receptor transactivation by X-irradiation. *Biochem Biophys Res Commun* 341:363-368.
- Lodder J y Zeilmaker GH. 1976. Effects of pelvic nerve and pudendal nerve transection on mating behavior in the male rat. *Physiology & behavior* 16 (6), 745-751.
- Luttrell LM, Ferguson SSG, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ y Lefkowitz RJ. 1999.  $\beta$ -Arrestin-dependent formation of  $\beta$ 2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science*, 283(5402), 655-661.
- MacLusky MJ y McEwen BS. 1978a. Oestrogen modulates progesterone receptor concentrations in some rat brain regions but not in others. *Nature* 274:276-278.
- Madlafousek J y Hlinak K. 1977. Sexual behaviour of the female laboratory rat: inventory, patterning, and measurement. *Behavior* 63:129-174.
- Majewski HK y Musgrave IF. 1995. Second messenger pathways in the modulation of neurotransmitter release. *Aust N Z J Med* 25:817-821.



- Malsbury CW, Kow LM y Pfaff DW. 1977. Effects of medial hypothalamic lesions on the lordosis response and other behaviors in female golden hamsters. *Physiol Behav* 19:223-237.
- Malsbury CW, Pfaff DW y Malsbury AM. 1981. Suppression of sexual receptivity in female hamsters: Neuroanatomical projections from preoptic and anterior hypothalamic sites. *Brain Res* 181:267-284.
- Maller JL. 2001. The elusive progesterone receptor in *Xenopus* oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(1), 8-10.
- Mani I y Wilson G. 2000. October. Robust temporal processing of news. In *Proceedings of the 38th Annual Meeting on Association for Computational Linguistics* (pp. 69-76). Association for Computational Linguistics.
- Mani SK. 2006. Signaling mechanisms in progesterone-neurotransmitter interactions. *Neuroscience* 138:773-781.
- Mani SK, Allen JM, Clark JH, Blaustein JD y O'Malley BW. 1994. Convergent pathways for steroid hormone-and neurotransmitter-induced rat sexual behavior. *Science*, 265(5176), 1246-1249.
- Mani SK, Allen JM, Rettori V, McCann SM, O'Malley BW y Clark JH. 1994. Nitric oxide mediates sexual behavior in female rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(14), 6468-6472.
- Mani SK, Blaustein JD, Allen JM, Law SW, O'Malley BW y Clark JH. 1994. Inhibition of rat sexual behavior by antisense oligonucleotides to the progesterone receptor. *Endocrinology*, 135(4), 1409-1414.
- Mani SK, Allen JM, Lydon, JP, Mulac-Jericevic B, Blaustein JD, DeMayo FJ y O'Malley BW. 1996. Dopamine requires the unoccupied progesterone receptor to induce sexual behavior in mice. *Molecular Endocrinology*, 10(12), 1728-1737.
- Mani SK, Blaustein JD y O'Malley BW. 1997. Progesterone receptor function from a behavioral perspective. *Horm Behav* 31:244-255.
- Mani S y Portillo W. 2010. Activation of progestin receptors in female reproductive behavior: interactions with neurotransmitters. *Front Neuroendocrinol* 31:157-171.
- Masters T. 1993. *Practical neural network recipes in C++*. Morgan Kaufmann.
- McEwen BS y Alves SE. 1999. Estrogen actions in the central nervous system 1. *Endocrine reviews*, 20(3), 279-307.

- McGinnis MY, Nance DM y Gorski RA. 1978. Olfactory, septal and amygdala lesions alone or in combination: effects on lordosis behavior and emotionality. *Physiol Behav* 20:435-440.
- McInerney EM y Katzenellenbogen BS. 1996. Different regions in activation function-1 of the human estrogen receptor required for antiestrogen-and estradiol-dependent transcription activation. *Journal of Biological Chemistry*, 271(39), 24172-24178
- McKenna SE, Simon NG y Cologer-Clifford A. 1992. An assessment of agonist/antagonist effects of tamoxifen in the female mouse brain. *Horm Behav* 26:536-544.
- Mhyre AJ y Dorsa DM. 2006. Estrogen activates rapid signaling in the brain: role of estrogen receptor  $\alpha$  and estrogen receptor  $\beta$  in neurons and glia. *Neuroscience*, 138(3), 851-858.
- Micevych PE y Dewing P. 2011. Membrane-initiated estradiol signaling regulating sexual receptivity. *Front. Endocrinol (Lausanne)* 2:26-34.
- Micevych P y Sinchak K. 2013. Temporal and concentration dependent estradiol effects on neural pathways mediating sexual receptivity. *J Neuroendocrinol* 25:1012-1023.
- Migliaccio A, Castoria G y Auricchio F. 2007. Src-dependent signalling pathway regulation by sex-steroid hormones: therapeutic implications. *Int J Biochem Cell Biol* 39:1343-1348.
- Migliaccio A, Castoria G, Domenico MD, de Falco A, Bilancio A, Lombardi M y Auricchio F. 2000. Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor  $\beta$ -Src complex triggers prostate cancer cell proliferation. *The EMBO journal*, 19(20), 5406-5417.
- Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, Nanayakkara M, Lombardi M, de Falco A y Auricchio F. 2005. Steroid receptor regulation of epidermal growth factor signaling through Src in breast and prostate cancer cells: steroid antagonist action. *Cancer research*, 65(22), 10585-10593.
- Migliaccio A, Piccolo D, Castoria G, Di Domenico M, Bilancio A, Lombardi M, Gong W, Beato M y Auricchio F. 1998. Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J* 17:2008-2018.
- Modianos DT, Hitt JC y Popolow HB. 1975. Habenular lesions and feminine sexual behavior of ovariectomized rats: Diminished responsiveness to the synergistic effects of estrogen and progesterone. *J Comp Psychol* 89:231-237.
- Moguilewsky M y Raynaud JR. 1979. Estrogen-sensitive progestin-binding sites in the female rat brain and pituitary. *Brain Res* 164:165-175.



- Moguilewsky M y Raynaud JP. 1979. The relevance of hypothalamic and hypophyseal progesterin receptor regulation in the induction and inhibition of sexual behavior in the female rat. *Endocrinology* 105:516-522.
- Moncada, S, Gryglewski RJ, Bunting S y Vane JR. 1976. A lipid peroxide inhibits the enzyme in blood vessel microsomes that generates from prostaglandin endoperoxides the substance (prostaglandin X) which prevents platelet aggregation. *Prostaglandins*, 12(5), 715-737.
- Morali G y Beyer C. 1979. Neuroendocrine control of mammalian estrous behavior. In: *Endocrine control of sexual behavior*. Beyer C. (Eds.), Raven Press New York pp. 33-75.
- Morali G, Larsson K y Beyer C. 1977. Inhibition of testosterone-induced sexual behavior in the castrated male rat by aromatase blockers. *Hormones and behavior*, 9(3), 203-213.
- Moss RL. 1971. Modification of copulatory behavior in the female rat following olfactory bulb removal. *J Comp Physiol Psychol* 74:374-382.
- Moss RL y Foreman MM. 1976. Potentiation of lordosis behavior by intrahypothalamic infusion of synthetic luteinizing hormone releasing hormone. *Neuroendocrinology* 20:176-181.
- Moss RL y McCann SM. 1973. Induction of mating behavior in rats by luteinizing hormone-releasing hormone. Moss, R. L., Dudley, C. A., & Kelly, M. J. (1978). Hypothalamic polypeptide releasing hormones: modifiers of neuronal activity. *Neuropharmacology*, 17(2), 87-93.
- Moss RL y McCann SM. 1975. Action of luteinizing hormone-releasing factor (LRF) in the initiation of lordosis behavior in the estrone-primed ovariectomized female rat. *Neuroendocrinology* 17:309-318.
- Nance DM, Shryne J y Gorsky RA. 1975. Effects of septal lesions on behavioral sensitivity of female rats to gonadal hormones. *Horm Behav* 6:59-64.
- Nemere I y Farach-Carson MC. 1998. Membrane receptors for steroid hormones: a case for specific cell surface binding sites for vitamin D metabolites and estrogens. *Biochemical and biophysical research communications*, 248(3), 443-449.
- Neve KA, Seamans JK y Trantham-Davidson H. 2004. Dopamine receptor signaling. *J Recept Signal Transduct Res* 24:165-205.
- Nock B y Feder HH. 1982. Neurotransmitter modulation of steroid action in target cells that mediate reproduction and reproductive behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 5(4), 437-447.
- Norris JD, Fan D, Kerner SA, McDonnell DP. 1997. Identification of a third autonomous activation domain within the human estrogen receptor. *Mol Endocrinol* . 11:747-754.



- Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Hiroi H, Orimo A, Hosoi T y Muramatsu M. 1998. The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor  $\beta$  (hER $\beta$ ) and Its Heterodimerization with ER  $\alpha$  in Vivo and in Vitro. *Biochemical and biophysical research communications*, 243(1), 122-126.
- Ogawa S, Kow LM y Pfaff DW. 1992. Effects of lordosis-relevant neuropeptides on midbrain periaqueductal gray neuronal activity in vitro. *Peptides* 13:965-975.
- Ojeda SR, Jameson HE y McCann SM. 1977. Developmental Changes in Pituitary Responsiveness to Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) in the Female Rat: Ovarian-Adrenal Influence During the Infantile Period 1. *Endocrinology*, 100(2), 440-451.
- Paxinos G y Watson C. 2006. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th ed. Academic Press, Australia.
- Petralia SM y Frye CA. 2006. In the ventral tegmental area, cyclic AMP mediates the actions of progesterone at dopamine type 1 receptors for lordosis of rats and hamsters. *Journal of neuroendocrinology*, 18(12), 902-914.
- Pfaff D, Martin EM y Kow LM. 2007. Generalized brain arousal mechanisms contributing to libido. *Neuropsychanalysis: An Interdisciplinary Journal for Psychoanalysis and the Neurosciences*, 9(2), 173-181.
- Pfaff DW. 1968. Uptake of 3H-estradiol by the female rat brain. An autoradiographic study. *Endocrinology*, 82(6), 1149-1155.
- Pfaff DW. 1973. Luteinizing hormone-releasing factor potentiates lordosis behavior in hypophysectomized ovariectomized female rats. *Science* 182:1148-1149.
- Pfaff DW y Sakuma Y. 1979a. Deficit in the lordosis reflex of female rats caused by lesions in ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Physiol* 288:203-210.
- Pfaff DW y Sakuma Y. 1979b. Facilitation of the lordosis reflex of female rats from the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Physiol* 288:189-202.
- Pfaff DW, Schuartz-Giblin S, McCarthy MM, y Kow LM. 1994. Cellular and molecular mechanisms of female reproductive behaviors. In: *The physiology of reproduction*. Knobil E y Neill D. (Eds.) Raven Press New York pp. 107-220.
- Pfaus JG, Smith WJ, Byrne N y Stephens G. 2000. Appetitive and consummatory sexual behaviors of female rats in bilevel chambers. II. Patterns of estrus termination following vaginocervical stimulation *Horm Behav*, 37 pp. 96-107

- Pietras RJ, Arboleda J, Reese DM, Wongvipa N, Pegram MD, Ramos L y Slamon DJ. 1995. HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene*, 10(12), 2435-2446.
- Pietras, Richard J y Clara M. Szego. 1977. "Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells". 69-72.
- Pietras RJ y Szego CM. 1979. Estrogen receptors in uterine plasma membrane. *Journal of steroid biochemistry*, 11(4), 1471-1483.
- Piwnicka-Worms H, Saunders KB, Roberts TM, Smith AE y Cheng SH. 1987. Tyrosine phosphorylation regulates the biochemical and biological properties of p60. *Cell*, 49(1), 75-82.
- Pollio G, Xue P, Zanisi M, Nicolin A y Maggi A. 1993. Antisense oligonucleotide blocks progesterone-induced lordosis behavior in ovariectomized rats. *Brain Res Mol Brain Res* 19:135-139.
- Powers JB. 1970. Hormonal control of sexual receptivity during the estrous cycle of rat. *Physiol Behav* 5:831-835.
- Qiu M y Lange CA. 2003. MAP-kinases couple multiple functions of human progesterone receptors: degradation, transcriptional synergy, and nuclear association. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85:147-157.
- Quysner A y Blaustein JD. 2001. A dopamine antagonist blocks vaginocervical stimulation-induced neuronal responses in the rat forebrain. *Brain Res* 921:173-182.
- Rainbow TC, McGinnis MY, Krey LC y McEwen BS. 1982. Nuclear progestin receptors in rat brain and pituitary. *Neuroendocrinology* 34:426-432.
- Ramírez-Orduña JM, Lima-Hernández FJ, García-Juárez M, González-Flores O y Beyer C. 2007. Lordosis facilitation by LHRH, PGE2 or db-cAMP requires activation of the kinase A pathway in estrogen primed rats. *Pharmacol Biochem Behav* 86:169-175.
- Reading DS y Blaustein JD. 1984. The relationship between heat abbreviation and neural progestin receptors in female rats. *Physiology & behavior*, 32(6), 973-981.
- Revelli A, Massobrio M y Tesarik J. 1998. Nongenomic Actions of Steroid Hormones in Reproductive Tissues I. *Endocrine reviews*, 19(1), 3-17.
- Riskind P y Moss RL. 1979. Midbrain central gray: LHRH infusion enhances lordotic behavior in estrogen-primed ovariectomized rats. *Brain Res Bull* 4:203-205.



- Robertson JA, Farnell Y, Lindahl LS y Ing NH. 2002. Estradiol up-regulates estrogen receptor messenger ribonucleic acid in endometrial carcinoma (Ishikawa) cells by stabilizing the message. *J Mol Endocrinol* 29:125-135.
- Rodgers CH y Law OT. 1967. The effects of habenular and medial forebrain bundle lesions on sexual behavior. *Psychon Sci* 8:1-2.
- Rodríguez-Manzo G, Cruz ML y Beyer C. 1986. Facilitation of lordosis behavior in ovariectomized estrogen primed rats by medial preoptic implantation of 5b, 3b-pregnanolone: a ring a reduced progesterone metabolite. *Physiol Behav* 36:277-281.
- Rodríguez-Sierra JF y Komisaruk BR. 1978. Lordosis induction in the rat by prostaglandin E2 sistemically or intracranially in the absense of ovarian hormones. *Prostaglandins* 15:513-524.
- Rodríguez-Sierra JF y Komisaruk BR. 1982. Common hyphothalamic sites for activation of sexual receptivity in female rats by LHRH, PGE2 and progesterone. *Neuroendocrinology* 35:363-369.
- Roskoski JrR. 2004. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochemical and biophysical research communications*, 324(4), 1155-1164.
- Rous P. 1909. The resistance to a specific hemolysin of human erythrocytes in health and disease. *The Journal of experimental medicine*, 11(6), 763.
- Rous P. 1910. A transmissible avian neoplasm.(Sarcoma of the common fowl.). *The journal of experimental medicine*, 12(5), 696-705.
- Rous P. 1911. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *The Journal of experimental medicine*, 13(4), 397-411.
- Rous P y Murphy JB. 1914. On the causation by filterable agents of three distinct chicken tumors. *The Journal of experimental medicine*, 19(1), 52-68.
- Roussel RR, Brodeur SR, Shalloway D y Laudano AP. 1991. Selective binding of activated pp60 c-src by an immobilized synthetic phosphopeptide modeled on the carboxyl terminus of pp60 c-src. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10696-10700.
- Rupprecht R, Reul JM, Trapp T, Steensel BV, Wetzel C, Damm K y Holsboer F. 1993. Progesterone receptor-mediated effects of neuroactive steroids. *Neuron*, 11(3), 523-530.
- Sachs AB, Bond MW y Kornberg RD. 1986. A single gene from yeast for both nuclear and cytoplasmic polyadenylate-binding proteins: domain structure and expression. *Cell*, 45(6), 827-835.



- Sakuma Y y Pfaff DW. 1979. Facilitation of female reproductive behavior from mesencephalic central gray in the rat. *Am J Physiol* 237:278-284.
- Sakuma Y y Pfaff DW. 1983. Modulation of the lordosis reflex of female rats by LHRH, its antiserum and analogs in the mesencephalic central gray. *Neuroendocrinology* 36:218-224.
- Schwartz SM, Blaustein JD y Wade G. 1979. Inhibition of estrous behavior by progesterone in rats: role of neural estrogen and progestin receptors. *Endocrinology* 1078-1082.
- Sellix MT, Egli M, Henderson RP y Freeman ME. 2004. Ovarian steroid hormones modulate circadian rhythms of neuroendocrine dopaminergic neuronal activity. *Brain research*, 1005(1), 164-181
- Selye H. 1942. Correlations between the chemical structure and the pharmacological actions of the steroids 1. *Endocrinology*, 30(3), 437-453.
- Shah BH, Farshori MP, Jambusaria A y Catt KJ. 2003. Roles of Src and epidermal growth factor receptor transactivation in transient and sustained ERK1/2 responses to gonadotropin-releasing hormone receptor activation. *J Biol Chem* 278:19118-19126.
- Shen T, Horwitz KB y Lange CA. 2001. Transcriptional hyperactivity of human progesterone receptors is coupled to their ligand-dependent down-regulation by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of serine 294. *Mol Cell Biol* 21:6122-6131.
- Shi CS y Kehrl JH. 2004. Pyk2 amplifies epidermal growth factor and c-Src-induced Stat3 activation. *J Biol Chem* 279:17224-17231.
- Shughrue PJ, Lane MV y Merchenthaler I. 1997. Comparative distribution of estrogen receptor-A and B mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neural* 388:507-525.
- Sicheri F, Moarefi I y Kuriyan J. 1997. Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature*, 385, 602-609.
- Siegel S y Castellan NJ. 1995. *Estadística no paramétrica: aplicada a las ciencias de la conducta*, 4a ed. Trillas, México.
- Simerly RB. 1990. Hormonal control of neuropeptide gene expression in sexually dimorphic olfactory pathways. *Trends in neurosciences*, 13(3), 104-110.
- Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW y Liao JK. 2000. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature*, 407(6803), 538-541.

- Simpkins JW, Singh M, Brock C y Etgen AM. 2012. Neuroprotection and estrogen receptors. *Neuroendocrinology*, 96(2), 119-130.
- Singer JJ. 1968. Hypothalamic control of male and female sexual behavior in female rat. *J Com Physiol Psychol* 66:738-742.
- Slim MS. 1977. Circular myotomy of the esophagus: clinical application in esophageal atresia. *The Annals of thoracic surgery*, 23(1), 62-67.
- Smart JE, Oppermann H, Czernilofsky AP, Purchio AF, Erikson RL y Bishop JM. 1981. Characterization of sites for tyrosine phosphorylation in the transforming protein of Rous sarcoma virus (pp60v-src) and its normal cellular homologue (pp60c-src). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(10), 6013-6017.
- Smith MS, Freeman ME y Neill JD. 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 1 2. *Endocrinology*, 96(1), 219-226.
- Sumano Lopez HS y Ocampo Camberos L. 1988. *Farmacología veterinaria*. México.
- Szego CM y Davis S. 1967. Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by oestrogen. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* 58, 1711-1718.
- Takeo Y. 1984. Influence of continuous illumination on estrous cycle of rats: time course of changes in levels of gonadotropins and ovarian steroids until occurrence of persistent estrus. *Neuroendocrinology* 39:97-104.
- Takimoto GS, Graham JD, Jackson TA, Tung L, Powell RL, Horwitz LD y Horwitz KB. 1999. Tamoxifen resistant breast cancer: coregulators determine the direction of transcription by antagonist-occupied steroid receptors. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 69(1), 45-50.
- Taylor IW, Musgnove EA, Fniendiander ML, Fo MS y Hedley DW. 1983. The influence of age on the DNA ploidy levels of breast tumors. *Eur J Cancer* 19:623.
- Toft D y Gorski J. 1966. A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 55(6), 1574.
- Tung WH, Hsieh HL, Lee IT y Yang CM. 2011. Enterovirus 71 modulates a COX-2/PGE2/cAMP-dependent viral replication in human neuroblastoma cells: role of the c-Src/EGFR/p42/p44 MAPK/CREB signaling pathway. *J Cell Biochem* 112:559-570.



- Turgeon JL y Waring DW. 1986. Modification of Luteinizing Hormone Secretion by Activators of Ca<sup>2+</sup>/Phospholipid-Dependent Protein Kinase\*. *Endocrinology*, 118(5), 2053-2058.
- Ushiro H y Cohen S. 1980. Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 255(18), 8363-8365.
- Vincent JL, Snyder AZ, Fox MD, Shannon BJ, Andrews JR, Raichle ME y Buckner RL. 2006. Coherent spontaneous activity identifies a hippocampal-parietal memory network. *Journal of neurophysiology*, 96(6), 3517-3531.
- Wakeling AE y Bowler J. 1987. Steroidal pure antiestrogens. *J Endocrinol* 112:R7-R10.
- Walf AA y Frye CA. 2008. Rapid and estrogen receptor beta mediated actions in the hippocampus mediate some functional effects of estrogen. *Steroids*, 73(9), 997-1007.
- Warembourg M. 1977. Radioautographic localization of estrogen-concentrating cells in the brain and pituitary of the guinea pig. *Brain research*, 123(2), 357-362.
- Warembourg M. 1978. Radioautographic study of the rat brain, uterus and vagina after R-5020 injection. *Molecular and cellular endocrinology*, 12(1), 67-79.
- Waring DW y Turgeon JL. 1992. A pathway for luteinizing hormone releasing-hormone self-potential: cross-talk with the progesterone receptor. *Endocrinology*, 130(6), 3275-3282.
- Watson CS y Gametchu B. 1999. Membrane - Initiated Steroid Actions and the Proteins that Mediate Them. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 220(1), 9-19.
- Wehling M. 1997. Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annual review of physiology*, 59(1), 365-393.
- Whalen RE y Lauber AH. 1986. Progesterone substitutes: cGMP mediation. *Neurosci Bio behav Rev* 10:47-53.
- Wolfe LS y Horrocks LA. 1994. Eicosanoids. In *Basic Neurochemistry* (Siegel G. J., Agranoff B. W., Albers R. W. and Molinoff P. B. Eds), pp. 475-490. Raven Press, New York.
- Wong DT y Todd R. 1999. Epidermal growth factor receptor (EGFR) biology and human oral cancer. *Histology and histopathology*, 14(2), 491-500.
- Wu TJ, Glucksman MJ, Roberts JL y Mani SK. 2006. Facilitation of lordosis in rats by a metabolite of luteinizing hormone releasing hormone. *Endocrinology* 147:2544-2549.



Xu N, Chen C-YA y Shyu A-B. 1997. Modulation of the fate of cytoplasmic mRNA by AU-rich elements: key sequence features controlling mRNA deadenylation and decay. *Mol. Cell. Biol.*, 17, 4611–4621.

Yeaman TJ. 2004. A renaissance for SRC. *Nature reviews cancer*, 4(6), 470-480.

Zemlan FP y Adler NT. 1977. Hormonal control of female sexual behavior in the rat. *Horm Behav* 9:345-357.

## 12. PUBLICACIONES

Hormones and Behavior 62 (2012) 579–584



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Hormones and Behavior

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yhbeh](http://www.elsevier.com/locate/yhbeh)



### Src kinase signaling mediates estrous behavior induced by 5 $\beta$ -reduced progestins, GnRH, prostaglandin E<sub>2</sub> and vaginocervical stimulation in estrogen-primed rats

Francisco J. Lima-Hernández<sup>a,b</sup>, Carlos Beyer<sup>a</sup>, Porfirio Gómora-Arrati<sup>a</sup>, Marcos García-Juárez<sup>a</sup>, José L. Encarnación-Sánchez<sup>a</sup>, Anne M. Etgen<sup>c</sup>, Oscar González-Flores<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigación en Reproducción Animal, Universidad Autónoma de Tlaxcala-CINVESTAV, Plaza Hidalgo S/N Ponotla, Tlaxcala, 90140, México

<sup>b</sup> Doctorado en Ciencias Naturales-UAT, Tlaxcala, Tlax, México

<sup>c</sup> Department of Neuroscience, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY 10461, USA

#### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 24 May 2012  
Revised 13 September 2012  
Accepted 14 September 2012  
Available online 23 September 2012

**Keywords:**  
Estradiol  
Lordosis behavior  
MAPK  
PP2  
5 $\beta$ -Dihydroprogesterone  
5 $\beta$ -Pregnan-3 $\beta$ -ol-20-one  
GnRH  
PGE<sub>2</sub>  
Src kinase

#### ABSTRACT

The progesterone receptor (PR) is a dual function protein that acts in the nucleus as a transcriptional factor and at the cytoplasm as a scaffold for the Src-MAPK signaling pathway. Several agents lacking affinity for the PR, such as 5 $\beta$ -reduced progestins, GnRH or prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) facilitate estrous behavior in ovariectomized (ovx), estrogen primed rats yet their action is blocked by the antiprogestin RU486. We hypothesize that these agents act by using the PR-Src-mitogen activated protein kinase alternative pathway. To test this hypothesis we used PP2, a specific inhibitor of the Src kinase family. Intraventricular infusion of 30  $\mu$ g of PP2, 30 min before behavioral testing, significantly attenuated estrous behaviors induced in estradiol benzoate (E<sub>2</sub>B) primed rats by 5 $\beta$ -dihydroprogesterone (5 $\beta$ -DHP), 5 $\beta$ -pregnan-3 $\beta$ -ol-20-one (5 $\beta$ -3 $\beta$ -Pg), GnRH, PGE<sub>2</sub> and by manual flank/vaginocervical stimulation. These results suggest that the Src signaling system, by activating mitogen activated protein kinases, participates in the facilitation of estrous behavior in E<sub>2</sub>B primed rats induced by agents lacking affinity for the PR.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

#### Introduction

A variety of agents including ring A-reduced progestins, peptides, amines, prostanoids, amino acids, growth factors (for review see: Beyer and González-Mariscal, 1986; Beyer et al., 2003; Blaustein, 2003; Davidze et al., 2007; Etgen and Acosta-Martínez, 2003; Mani, 2006; Mani et al., 2006; Moss and Foreman, 1976; Rodríguez-Sierra and Komisaruk, 1978) and vaginocervical stimulation, VCS (Komisaruk, 1971; Rodríguez-Sierra et al., 1975) can substitute for progesterone (P) to facilitate lordosis behavior in ovariectomized (ovx) rats primed with estrogen. The mechanism through which these chemicals achieve their effect is unclear. Surprisingly, the progestin receptor (PR) antagonist RU486 blocks the stimulatory effect of all of these agents, even of VCS, on estrous behaviors in estrogen-primed rats (Auger, 2001; Auger et al., 1997; Beyer et al., 1997; González-Flores et al., 2008; González-Mariscal

et al., 1989). Because these agents do not bind the PR their effect is difficult to reconcile with the "classical" model of PR action, which requires the binding of an agonist, e.g. P, to trigger the transcriptional actions of the PR at the nuclear level. Recent data, however, show that the PR is a dual function protein acting in the nucleus in its "classical" role as a transcription factor and in the cytoplasm by activating the Src family of non-receptor tyrosine kinases-mitogen activated protein kinase (Src-MAPK) signaling pathway (for review see; Boonyaratankornkit and Edwards, 2007; Daniel et al., 2009; Edwards, 2005; Lange, 2004; Leonhardt et al., 2003). Interestingly some of the above mentioned agents activate the Src-MAPK pathway in a variety of tissues: ring A-reduced progestins in platelets (Blackmore, 2008), GnRH in gonadotropes (Davidson et al., 2004; Dobbin-Belkman et al., 2009) and in a hypothalamic neural cell line GT1-7 (Shah et al., 2003) and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) in embryonic stem cells (Yun et al., 2009). Moreover, we recently showed that PP2, a selective inhibitor for Src, decreased the behavioral response to P and its ring A reduce metabolites in ovx, estrogen-primed rats (González-Flores et al., 2010). Therefore, in the present study we hypothesized that the Src signaling system participates in the facilitation of estrous behaviors in ovx, estradiol (E<sub>2</sub>) primed rats by agents lacking affinity for the PR including 5 $\beta$ -dihydroprogesterone (5 $\beta$ -DHP), 5 $\beta$ -pregnan-3 $\beta$ -ol-20-one (5 $\beta$ -3 $\beta$ -Pg), GnRH, and PGE<sub>2</sub> or by VCS using PP2, a specific inhibitor of the Src kinase family.

\* Corresponding author at: Centro de Investigación en Reproducción Animal, Apartado Postal No 62, Tlaxcala, Tlax, C.P. 90000, México. Fax: +52 246 46 21727. E-mail addresses: [ogzflo@gmail.com](mailto:ogzflo@gmail.com), [ogzflo@hotmail.com](mailto:ogzflo@hotmail.com) (O. González-Flores).



## Material and methods

### Animals and surgeries

We used a total of 109 Sprague-Dawley female rats (240–280 g body weight), bred in our colony in Tlaxcala. They were maintained under controlled temperature ( $23 \pm 2$  °C) and light conditions (14:10 L:D) with Purina rat chow and water provided ad libitum. Females were bilaterally ovx under anesthesia with xylazine (4 mg/kg) and ketamine (80 mg/kg), and housed in groups of four. Two weeks after ovx, the females were anesthetized with xylazine and ketamine, placed in a Kopf stereotaxic instrument (Tujunga, CA), and implanted with a 22 ga stainless steel guide cannula (Plastics One, Roanoke, VA) into the right lateral ventricle following coordinates from the atlas of Paxinos and Watson (2006; A/P +0.80 mm, M/L –1.5 mm, D/V –3.5 mm with respect to bregma). A stainless steel screw was fixed to the skull, and both cannula and screw were attached to the bone with dental cement. A 30 ga insert cannula provided with a cap was introduced into the guide cannula to prevent clogging and contamination. Animal care and all the experimental procedures adhered to NIH guidelines and the Mexican Law for the Protection of Animals.

### Drugs

Estradiol benzoate ( $E_2B$ ),  $5\beta$ -DHP,  $5\beta,3\beta$ -Pgl, GnRH and  $PGE_2$  were purchased from Sigma (St. Louis, MO). The specific inhibitor of the Src kinase family 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(*t*-butyl) pyrazolo [3,4-*d*] pyrimidine (PP2; Hanke et al., 1996; Li et al., 2006) was purchased from Calbiochem (San Diego, CA).

### Testing procedures

Tests for sexual behaviors (receptivity and proceptivity) were conducted by placing females in a circular Plexiglas arena (53 cm in diameter) with a sexually active male. Tests were made during the dark phase of the light–dark cycle. The lordosis quotient [LQ—(number of lordosis/10 mounts)(100)] was used to assess receptive behavior. Proceptivity was evaluated by determining the incidence of hopping, darting and ear-wiggling during the entire receptivity test. We considered an animal proceptive when showing two of these behaviors during the testing period. This criterion was used because in our Sprague-Dawley rats only a small proportion of animals display the three proceptive behaviors together. This may be due to the fact that our Sprague-Dawley rats rarely (<10%) show darting in our testing conditions. Behavioral tests were conducted at 60, 120 and 240 min after administration of experimental agents or VCS.

### Experiment 1: effect of PP2 on estrous behavior induced by $5\beta$ -DHP or $5\beta,3\beta$ -Pgl

#### Control group

One week after implantation of a cannula into the lateral ventricle, rats were injected sc with 5  $\mu$ g of  $E_2B$  (hour 0) and 39.5 h later received an icv infusion of 10% DMSO/1  $\mu$ l (vehicle for PP2); 30 min later (40 h after  $E_2B$ ) they received either vehicle (1  $\mu$ l of sesame oil,  $n=8$ ) or the progestins: 130 ng of either  $5\beta$ -DHP ( $n=10$ ) or  $5\beta,3\beta$ -Pgl ( $n=9$ ). The dose of progestins used was found to be effective in eliciting estrous behaviors in ovx rats primed with 5  $\mu$ g of  $E_2B$  (Gómez-Arriati et al., 2008).

#### Experimental groups

These animals received an icv injection of 30  $\mu$ g of PP2 (dissolved in 10% of DMSO) 39.5 h after 5  $\mu$ g of  $E_2B$ ; at 40 h (i.e., 30 min after PP2) 130 ng of  $5\beta$ -DHP ( $n=8$ ) or  $5\beta,3\beta$ -Pgl ( $n=8$ ) in 1  $\mu$ l of sesame oil was infused.

### Experiment 2: effect of PP2 on estrous behavior induced by GnRH and $PGE_2$

#### Control groups

Ovx animals were primed with 5  $\mu$ g of  $E_2B$ , and 39.5 h later were infused icv with 10% DMSO/1  $\mu$ l. Thirty minutes later (40 h after  $E_2B$ ) they received an icv infusion of 1  $\mu$ l saline (control,  $n=8$ ) or 50 ng of GnRH ( $n=9$ ) or 1  $\mu$ g of  $PGE_2$  ( $n=9$ ) dissolved in 1  $\mu$ l of saline. The doses of GnRH and  $PGE_2$  have been found effective in eliciting estrous behavior in ovx,  $E_2B$ -primed female rats (Ramírez-Orduña et al., 2007).

#### Experimental groups

Instead of DMSO alone, rats received 30  $\mu$ g of PP2 in DMSO icv at 39.5 h after  $E_2B$  priming and 30 min later either 50 ng of GnRH ( $n=9$ ) or 1  $\mu$ g of  $PGE_2$  ( $n=8$ ).

### Experiment 3: effect of PP2 on estrous behavior induced by manual flank stimulation (MF) plus VCS

Ovx rats were injected with 5  $\mu$ g of  $E_2B$ . Forty hours later, animals were divided into two treatment groups. The control rats received 1  $\mu$ l of DMSO (10%) and 30 min later MF/VCS ( $n=10$ ); the experimental rats received 30  $\mu$ g of PP2 in DMSO and 30 min later MF/VCS ( $n=13$ ). MF consisted of palpations applied with the finger and thumb to both flanks and with the palm of the hand to the perineal area. VCS consisted of 150 g of pressure into the vagina and cervix through a calibrated vaginal probe applied together with MF for approximately 5 s (González-Flores et al., 2007).

### Histological confirmation of cannula placement

Twenty-four hours after completion of the experiments, females were deeply anesthetized with ether, and 1% methylene blue was administered through the cannula. The brain was removed and sectioned in the transverse plane to check the cannula position in the right lateral ventricle. Eight animals whose cannulae were not in the ventricle were discarded from the experiment.

### Statistical analysis

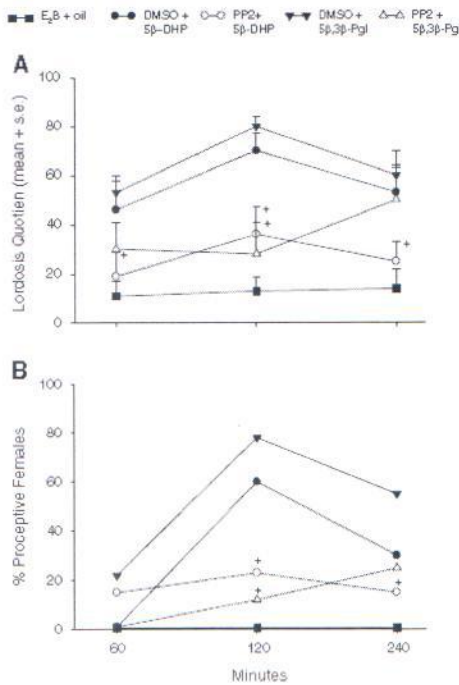
The effects of the progestins, GnRH,  $PGE_2$  and MF/VCS on estrous behavior, were assessed by comparing the LQ and the percentage of proceptive animals obtained in response to each agent versus data obtained in control animals receiving  $E_2B$  plus DMSO (solvent). A Friedman two way analysis was initially performed to reveal significant differences in LQ values between groups. The effect of PP2 on the behavioral actions of progestins, GnRH,  $PGE_2$  and MF/VCS was assessed by comparing the LQs (60, 120 and 240 min) obtained with each agent versus those obtained when PP2 was administered using the Wilcoxon-Mann-Whitney *U*-test (Bruning and Kintz, 1987). The multiple chi square was used to compare proportions of proceptive animals among groups, followed when appropriate by a Fischer's exact probability test to compare the proportion of proceptive females among experimental and control groups at 60, 120 and 240 min.

## Results

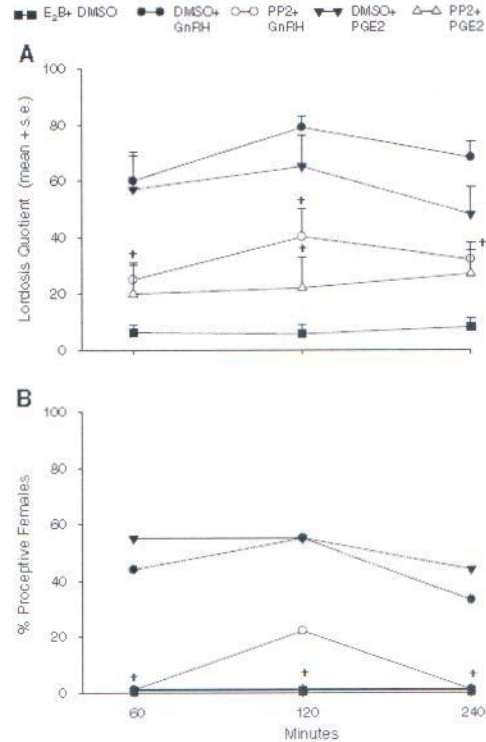
### Experiment 1

Fig. 1A shows that icv infusion of both  $5\beta$ -reduced progestins significantly increased lordosis behavior at the three time intervals tested when compared with the control animals given  $E_2B$  and infused with oil (Friedman:  $F=52$ ,  $df=2, 32$ ,  $p<0.01$ ).  $E_2B$  alone failed to elicit either lordosis or proceptivity in our ovx animals. The temporal course of the response to the two progestins was similar, with





**Fig. 1.** Intracerebral infusion of 130 ng of both 5β-DHP (n = 10) and 5β,3β-Pgl (n = 9), significantly stimulated lordosis behavior in ovariectomized rats primed with 5 μg of E<sub>2</sub>B 40 h before progesterin treatment. Animals primed with 5 μg of E<sub>2</sub>B and infused only with vehicle (DMSO; n = 8) failed to display lordosis or proceptive behaviors. A significant response was already observed to 5β,3β-Pgl at 60 min postinjection, but maximal effects on lordosis and proceptive behaviors were observed at the 120 min postinjection interval in the two progestins. Icv injection of PP2 (30 μg), a Src kinase inhibitor, 30 min before the 5β-DHP (n = 8) or 5β,3β-Pgl (n = 8), significantly decreased both lordosis behavior and proceptive responses to both progestins. \*p < 0.05, 5β progestins vs PP2 plus 5β progestins.



**Fig. 2.** Intracerebral infusion of 50 ng of GnRH (n = 9) or 1 μg of PGE<sub>2</sub> (n = 9) elicits lordosis and proceptive behaviors in ovariectomized rats primed with 5 μg of E<sub>2</sub>B 40 h before. Control animals injected only with E<sub>2</sub>B and solvent (n = 8), failed to display lordosis or proceptive behaviors. Icv injection of PP2 (30 μg), significantly decreased the behavioral responses (lordosis and proceptivity) to GnRH (n = 9) at all time intervals tested and at 60 and 120 min to PGE<sub>2</sub> (n = 8). \*p < 0.05, GnRH or PGE<sub>2</sub> vs PP2 plus GnRH or PGE<sub>2</sub>.

maximal LQ values being observed at 120 min (F = 46.8, df = 2, 31, p < 0.001). The two progestins also induced proceptive behavior in most females; maximal proceptivity was also observed at 120 min (Fig. 1B) (multiple chi square = 18.0, df = 2, p < 0.001). Administration of PP2 significantly decreased LQ scores in animals infused with 5β-DHP at all times tested (Fig. 1A). In females given 5β,3β-Pgl, PP2 inhibited lordosis significantly only at 120 min after progesterin injection (p < 0.01). PP2 suppressed the proceptive behaviors induced by both progestins at the 120 minute test (Fig. 1B; p < 0.05 for 5β-DHP; p < 0.01 for 5β,3β-Pgl), but not at 60 or 240 min.

**Experiment 2**

Fig. 2 shows the effects on both lordosis and proceptive behavior of the icv administration of 50 ng of GnRH and 1 μg of PGE<sub>2</sub> alone and combined with 30 μg of PP2. At these doses, both drugs induced significant lordosis and proceptive behaviors, with the highest response obtained at 120 min (F = 19.9, df = 1, 32, p < 0.001; multiple chi square = 17.6, df = 2, p < 0.01, respectively), when compared with the control animals (E<sub>2</sub>B plus saline). PP2 significantly blocked the lordosis induced by GnRH at all times tested (p < 0.01) and also inhibited

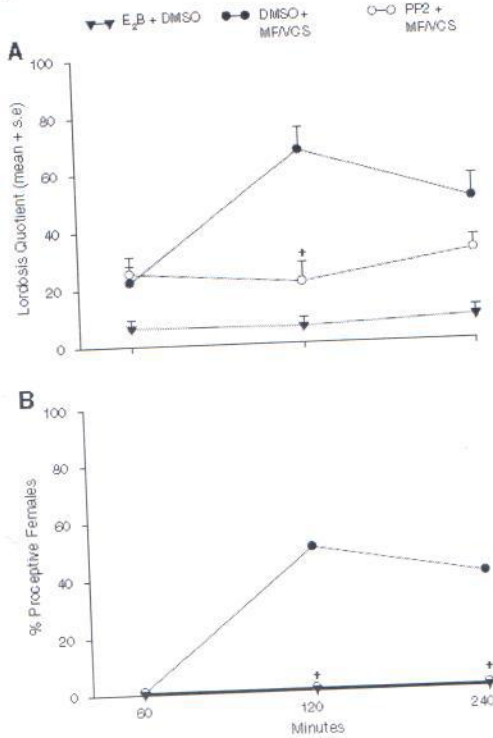
proceptivity at 60 and 120 min (p < 0.05). PP2 also decreased the facilitation of lordosis induced by PGE<sub>2</sub> at 60 and 120 min post injection and of proceptive behaviors at all three time test intervals (p < 0.05).

**Experiment 3**

Fig. 3 shows the effect of PP2 on the estrous behaviors (lordosis and proceptivity) induced by MF/VCS. In contrast with the temporal course of the behavioral response obtained with progestins, GnRH and PGE<sub>2</sub>, the response to MF/VCS was delayed until 120 min post-stimulation. The icv administration of PP2 30 min before MF/VCS significantly reduced lordosis at 120 min and suppressed proceptive behavior at 120 and 240 min (p < 0.05).

**Discussion**

Our present results support our hypothesis that agents that do not bind the PR facilitate estrous behavior by activating the Src signaling pathway. Because PP2 also blocked the effect of P and its 5α ring



**Fig. 3.** Vagino-cervical stimulation to ovariectomized rats ( $n = 10$ ) 40 h following priming with 5  $\mu$ g of E<sub>2</sub>B elicited clear facilitation of both lordosis and proceptivity 120 min after the procedure. Control animals injected with 5  $\mu$ g of E<sub>2</sub>B and the solvent DMSO ( $n = 8$ ) failed to display estrous behavior. \* $p < 0.05$ , MF/VCS vs PP2 plus MF/VCS. The Src kinase inhibitor PP2 prevented the facilitatory effect of MF/VCS ( $n = 13$ ) on both lordosis and proceptive behaviors at the 120 min interval testing.

A-reduced metabolites on estrous behavior, it appears that activation of the Src kinase is an essential process for the expression of lordosis and proceptive behaviors in E<sub>2</sub>B-primed rats irrespective of the agent or procedure stimulating them (González-Flores et al., 2010). There is evidence that Src associated with the PR exerts its action by activating the MAPK pathway (Boonyaratankornkit et al., 2001; Faivre et al., 2005; Migliaccio et al., 1998). Support for this mechanism comes from recent studies showing that the facilitating effect of ring A-reduced progestins, GnRH and PGE<sub>2</sub> was blocked by *in vivo* administration of the MAPK inhibitor PD98059 in ovx, E<sub>2</sub>B-primed rats (González-Flores et al., 2004b, 2009).

It is unclear how the agents used in this study activate the PR–Src complex. Chemicals could act directly on either neurons having the PR–Src complex or in neurons with synaptic connections with them. Activation of these last neurons could release neurotransmitters capable of stimulating estrous behavior, e.g., dopamine, norepinephrine, acetylcholine, etc. (for review see, Beyer and González-Mariscal, 1986; Beyer et al., 2003; Blaustein, 2003; Etgen, 2003; Mani, 2006; Mani and Portillo, 2010) by acting on PR–Src containing neurons. Indeed, there is evidence that ring A-reduced progestins act, at least partially, through GnRH release, because the GnRH-1 receptor antagonist, antide, decreases their effects on estrous behaviors (Cómora-Arañal et al., 2008).

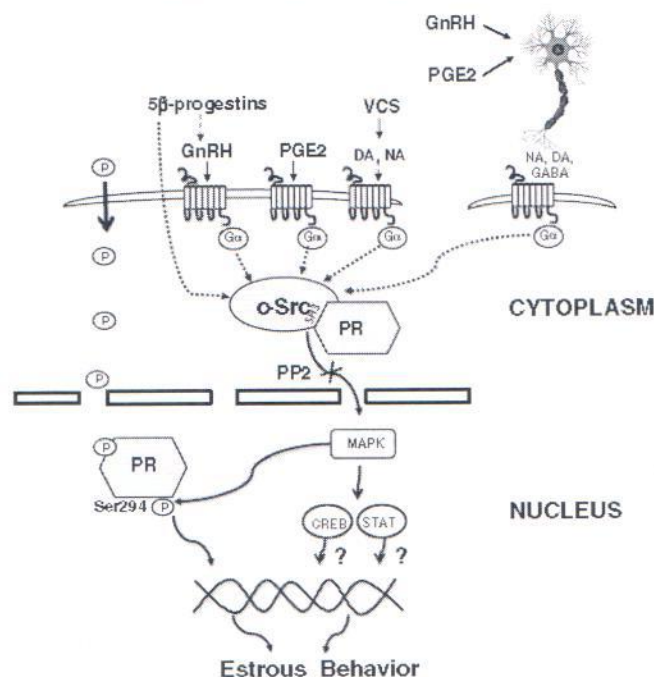
It is also probable that GnRH, PGE<sub>2</sub> and 5 $\beta$  pregnanes act directly on PR-expressing neurons. This idea is supported by the finding that they elicit lordosis behavior when implanted or infused into the ventromedial nucleus of the hypothalamus, a region with a high density of PR containing neurons (Moss and Foreman, 1976; Rodríguez-Sierra and Komisaruk, 1978).

As shown in Fig. 4, behaviorally effective agents need not directly interact with the PR–Src complex. Both GnRH and PGE<sub>2</sub> act on membrane receptors (linked to G proteins) to generate second messengers, which through kinase activation modulates various processes including estrous behaviors (for review see Mani and Portillo, 2010). Similarly, VCS releases neurotransmitters (dopamine, norepinephrine, etc., Masters et al., 1993; Quysner and Blaustein, 2001) that also act on G protein linked receptors (Etgen et al., 2001; Majewski and Musgrave, 1995; Neve et al., 2004). There is abundant evidence that G protein-coupled receptors, through kinases such as protein kinase A and C, can interact with tyrosine kinase receptors and Src–MAPK in many cell systems (Lange, 2004; Lange et al., 1998; Migliaccio et al., 1998).

The mechanism through which the Src–MAPK pathway stimulates estrous behaviors is not clear. Fig. 4 illustrates some of the well-established actions of the PR–Src–MAPK complex that might be related to the stimulation of estrous behavior. The PR produces a rapid activation of the Src–MAPK (2–5 min) that decays by 10 min (Boonyaratankornkit et al., 2001; Migliaccio et al., 1998). This transient action produces non-transcriptional effects on ion channels such as those associated with ionotropic glutamate, GABA and acetylcholine receptors (Charpentier et al., 2005; Choi et al., 2011; Groveman et al., 2012), and voltage gated ion channels (Endoh, 2005). Although these pathways alter neuronal excitability, the possibility that such rapid and transient effects are directly related to the expression of estrous behavior is doubtful, because lordosis is rarely displayed earlier than 60 min after administration of the agents used in this study (GnRH, PGE<sub>2</sub> and 5 $\beta$ -reduced progestins). However, it is possible that these early events trigger subsequent changes mediating the delayed expression of estrous behavior. The PR–Src interaction not only mediates non-genomic actions of P, but also represents an alternative mechanism for PR to activate gene transcription without directly interacting in the nucleus with target genes (Boonyaratankornkit and Edwards, 2007; Boonyaratankornkit et al., 2008; Leonhardt et al., 2003). In some cases these genomic effects result from interacting with intermediate molecules such as cAMP response element-binding protein (CREB) or signal transducer and activator of transcription family members (STATs; see Fig. 4), resulting in transcriptional activation through DNA response elements different from those activated by PR binding to progestin response elements (Shi and Kehrl, 2004; Tung et al., 2011). As shown in Fig. 4, the PR–Src–MAPK pathway can also modulate the nuclear PR by phosphorylating serine 294, a process that enhances the transcriptional activity of the PR and targets it for subsequent degradation by the 26S proteasome (Camacho-Arroyo et al., 2002; Faivre et al., 2005; Lange et al., 1998; Qiu and Lange, 2003). Although this could constitute a process through which GnRH, PGE<sub>2</sub> or the 5 $\beta$  progestins stimulate lordosis behavior, the fact that these agents do not cause sequential inhibition of lordosis (González-Flores et al., 2004a; González-Mariscal et al., 1993), a process resulting from ser294 phosphorylation of the PR (Lange et al., 2000; Shen et al., 2001), does not support this idea.

The present results indicate that Src plays an essential role in the facilitation of estrous behavior in estrogen-primed rats not only by progestins but also by a variety of agents with diverse chemical structures. This action appears to be exerted by Src as a component of a complex with PR–B, the full length isomer of the PR. Further studies, however, are required to determine if activation of Src by agents without affinity for PR is mediated by the PR, as in the case when the receptor is bound by its ligand, or if the PR serves only as a scaffold for Src, thus, allowing the recruitment of enzymatic effectors capable of modulating Src activity.





**Fig. 4.** Diagram of the possible mechanisms of action through which 5 $\beta$  progestins, GnRH, PGE<sub>2</sub> and vagino-cervical stimulation (VCS) activates the PR-Src system to elicit estrous behaviors in ovx, E<sub>2</sub>B primed rats. As shown in the upper right section of the diagram GnRH and PGE<sub>2</sub> may act on interneurons projecting to neurons containing the PR-Src complex, resulting in release of neurotransmitters capable of stimulating estrous behaviors (dopamine, norepinephrine, GABA, etc.). Similarly, VCS stimulates release of norepinephrine and dopamine, which act on G protein-coupled membrane receptors (GPCR). A direct action on the PR-Src neurons is shown on the left side of the diagram. GnRH and monoamines act on membrane GPCRs to activate second messenger-regulated serine/threonine kinases. Stimulation of GPCRs activates Src kinase through several direct and indirect mechanisms (dashed line). 5 $\beta$  progestins also stimulate Src activity by either acting at the membrane or indirectly through releasing GnRH. Src signaling through the MAPK system occurs in the context of a multiprotein complex in which the PR acts as a scaffold to recruit an assortment of enzymatic effectors. Activation of the Src-MAPK system results in rapid and transient membrane effects on ion channels and membrane receptors and delayed genomic effects mediated through proteins like CREB or STATs modulating gene transcription. Src-MAPK signaling also interacts with the classical pathways of PR action by phosphorylating ser-294 in this protein, a reaction enhancing its transcriptional activity. The crest on the arrow indicates the site of PP2<sub>B</sub> inhibitory effect on Src action.

#### Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the technical assistance of Guadalupe Domínguez-López. This work was supported by CONACYT/134291.

#### References

- Auger, A.P., 2001. Ligand-independent activation of progesterin receptors: relevance for female sexual behavior. *Reproduction* 122, 847–855.
- Auger, A.P., Moffatt, C.A., Blaustein, J.D., 1997. Progesterone-independent activation of rat brain progesterin receptors by reproductive stimuli. *Endocrinology* 138, 511–514.
- Beyer, C., González-Mariscal, G., 1986. Elevation in hypothalamic cyclic AMP as a common factor in the facilitation of lordosis in rodents: a working hypothesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 474, 270–281.
- Beyer, C., González-Flóres, O., González-Mariscal, G., 1997. Progesterone receptor participates in the stimulatory effect of LHRH, prostaglandin E<sub>2</sub> and cyclic AMP on lordosis and proceptive behavior in rats. *J. Neuroendocrinol.* 9, 609–614.
- Beyer, C., González-Flóres, O., García-Juárez, M., González-Mariscal, G., 2003. Non-ligand activation of estrous behavior in rodents: cross-talk at the progesterone receptor. *Scand. J. Psychol.* 44, 221–229.
- Bladmore, P.F., 2008. Progesterone metabolites rapidly stimulate calcium influx in human platelets by a src-dependent pathway. *Steroids* 73, 738–750.
- Blaustein, J.D., 2003. Progesterin receptors: neuronal integrators of hormonal and environmental stimulation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1007, 238–250.
- Boonyaratanalornkit, V., Edwards, D.A., 2007. Receptor mechanisms mediating non-genomic actions of sex steroids. *Semin. Reprod. Med.* 25, 139–153.
- Boonyaratanalornkit, V., Scott, M., Ebon, V., Sherman, L., Anderson, S., Miller, J., Miller, W., Edwards, D.A., 2001. Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinase. *Mol. Cell* 8, 269–280.
- Boonyaratanalornkit, V., Bi, Y., Rudd, M., Edwards, D.P., 2008. The role and mechanism of progesterone receptor activation of extra-nuclear signaling pathways in regulating gene transcription and cell cycle progression. *Steroids* 73, 922–928.
- Bruning, J.L., Kintz, B.L. (Eds.), 1987. *Computational Handbook of Statistics*. Freeman and Company, London.
- Carnacho-Arroyo, L., Villamar-Cruz, O., González-Arenas, A., Guerra-Araiza, C., 2002. Participation of 26S proteasome in the regulation of progesterone receptor concentrations in the rat brain. *Neuroendocrinology* 75, 267–271.
- Charpentier, E., Wiesner, A., Huh, K.H., Ogier, R., Hoda, J.C., Allaman, G., Ragenbass, M., Feuerbach, D., Bertrand, D., Fuhner, C., 2005. Alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptors are negatively regulated by tyrosine phosphorylation and Src-family kinases. *J. Neurosci.* 25, 9836–9849.
- Choi, U.B., Xiao, S., Wollmuth, L.P., Bowen, M.E., 2011. Effect of Src kinase phosphorylation on disordered C-terminal domain of N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor subunit GluN2B protein. *J. Biol. Chem.* 286, 29904–29912.
- Daniel, A.R., Knutson, T.P., Lange, C.A., 2009. Signaling inputs to progesterone receptor gene regulation and promoter selectivity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 308, 47–52.
- Davidson, L., Pawson, A.J., López de Marañón, R., Freestone, S.H., Barran, P., Millar, R.P., Maudsley, S., 2004. Gonadotropin-releasing hormone-induced activation of diacylglycerol kinase- $\alpha$  and its association with active c-src. *J. Biol. Chem.* 279, 11906–11916.
- Devidze, N., Lee, A.W., Zhou, J., Pfaff, D.W., 2007. CNS arousal mechanisms: bearing on sex and other biologically regulated behaviors. *Endocr. Rev.* 28, 1–19.



- Dehlin-Bekman, M., Naidich, M., Bahamín, L., Przedeció, F., Abmog, T., Lim, S., Melamed, P., Liu, P., Wohland, T., Yan, Z., Seger, R., Naor, Z., 2009. A preformed signaling complex mediates GnRH-activated ERK phosphorylation of Paxillin and FAK at focal adhesions in L beta T2 gonadotrope cells. *Mol. Endocrinol.* 23, 1850–1864.
- Edwards, D.P., 2005. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu. Rev. Physiol.* 67, 335–376.
- Endoh, T., 2005. Involvement of Src tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase in the facilitation of calcium channels in rat nucleus of the tractus solitarius by angiotensin II. *J. Physiol.* 568, 851–865.
- Ergen, A.M., 2003. Ovarian steroid and growth factor regulation of female reproductive function involves modification of hypothalamic alpha 1-adrenoceptor signaling. *Anu. N. Y. Acad. Sci.* 1007, 153–161.
- Ergen, A.M., Acosta-Martínez, M., 2003. Participation of growth factor signal transduction pathways in estradiol-facilitation of female reproductive behavior. *Endocrinology* 144, 3828–3835.
- Ergen, A.M., Anisoff, M.A., Querada, A., 2001. Mechanisms of ovarian steroid regulation of norepinephrine receptor-mediated signal transduction in the hypothalamus: implications for female reproductive physiology. *Horm. Behav.* 40, 169–177.
- Favre, E., Shiddu, A., Pierson-Mullany, L., Lange, C.A., 2005. Integration of progesterone receptor mediated rapid signaling and nuclear actions in breast cancer cell models: role of mitogen-activated protein kinases and cell cycle regulators. *Stereoids* 70, 418–426.
- Gómora-Arrati, P., Beyer, C., Lima-Hernández, F.J., Gracia, M.E., Ergen, A.M., González-Flores, O., 2008. GnRH mediates estrous behavior induced by ring A reduced progesterins and vaginocervical stimulation. *Behav. Brain Res.* 187, 1–8.
- González-Flores, O., Guerra-Araiza, C., Cerbón, M., Camacho-Arroyo, L., Ergen, A.M., 2004a. The 26S proteasome participates in the sequential inhibition of estrous behavior induced by progesterone in rats. *Endocrinology* 145, 2328–2336.
- González-Flores, O., Shu, J., Camacho-Arroyo, L., Ergen, A.M., 2004b. Regulation of lordosis by cyclic 3'-5'-guanosine monophosphate, progesterone, and its alpha-reduced metabolites involves mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 145, 5560–5567.
- González-Flores, O., Beyer, C., Lima-Hernández, F.J., Gómora-Arrati, P., Gómez-Camarillo, M.A., Hoffman, K., Ergen, A.M., 2007. Facilitation of estrous behavior by vaginal cervical stimulation in female rats involves alpha-adrenergic receptor activation of the nitric oxide pathway. *Behav. Brain Res.* 176, 237–243.
- González-Flores, O., Ergen, A.M., Komisaruk, B.K., Gómora-Arrati, P., Macías-Jiménez, A., Lima-Hernández, F.J., García-Juárez, M., Beyer, C., 2008. Antagonists of the protein kinase A and mitogen-activated protein kinase systems and of the progesterin receptor block the ability of vaginocervical/flank-perineal stimulation to induce female rat sexual behavior. *J. Neuroendocrinol.* 20, 1361–1367.
- González-Flores, O., Gómora-Arrati, P., García-Juárez, M., Gómez-Camarillo, M.A., Lima-Hernández, F.J., Beyer, C., Ergen, A.M., 2009. Nitric oxide and ERK/MAPK mediation of estrous behavior induced by GnRH, PGE<sub>2</sub> and db-cAMP in rats. *Physiol. Behav.* 86, 606–612.
- González-Flores, O., Beyer, C., Gómora-Arrati, P., García-Juárez, M., Lima-Hernández, F.J., Soto-Sánchez, A., Ergen, A.M., 2010. A role for Src kinase in progesterin facilitation of estrous behavior in estradiol-primed female rats. *Horm. Behav.* 58, 223–229.
- González-Mariscal, G., González-Flores, O., Beyer, C., 1989. Intrahypothalamic injection of BI486 antagonizes the lordosis induced by ring A-reduced progesterins. *Physiol. Behav.* 46, 435–438.
- González-Mariscal, G., Melo, A.I., Beyer, C., 1993. Progesterone but not LHRH or prostaglandin E<sub>2</sub> induces sequential inhibition of lordosis to various lordogenic agents. *Neuroendocrinology* 57, 940–945.
- Goverman, B.R., Peng, S., Fang, X.Q., Pflueger, M., Lin, S.X., Benkiewicz, E.A., Yu, X., 2012. The regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by Src kinase. *EBioS* 1, 279, 20–28.
- Hankle, J.H., Gardner, J.P., Dow, R.L., Changchien, P.S., Brissette, W.H., Werninger, E.J., Pollock, B.A., Connolly, P.A., 1996. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of lck- and FynT-dependent T cell activation. *J. Biol. Chem.* 271, 695–701.
- Komisaruk, B.R., 1971. Induction of lordosis in ovariectomized rats by stimulation of the vaginal cervix: hormonal and neural interrelationships. In: Sawyer, C.H., Gorski, R.A. (Eds.), *Steroid Hormones and Brain Function*. University of California Press, Berkeley, pp. 127–136.
- Lange, C.A., 2004. Making sense of cross-talk between steroid hormone receptors and intracellular signaling pathways: who will have the last word? *Mol. Endocrinol.* 18, 269–278.
- Lange, C.A., Rikher, J.K., Shen, T., Horwitz, K.B., 1998. Convergence of progesterone and epidermal growth factor signaling in breast cancer. Potentiation of mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Biol. Chem.* 273, 31317–31324.
- Lange, C.A., Shen, T., Horwitz, K.B., 2000. Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 1032–1037.
- Leonhardt, S., Boonyasatanalornkit, V., Edwards, D.A., 2003. Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms. *Stereoids* 68, 761–770.
- Li, Z., Hosoi, Y., Cai, L., Tanno, Y., Matsumoto, Y., Enomoto, A., Morita, A., Nalagawa, K., Miyagawa, K., 2006. Src tyrosine kinase inhibitor PP2 suppresses ERK1/2 activation and epidermal growth factor receptor transactivation by X-irradiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341, 343–368.
- Majewski, H.K., Muirgrave, I.F., 1995. Second messenger pathways in the modulation of neurotransmitter release. *Anat. N. Z. J. Med.* 25, 817–821.
- Mani, S.K., 2006. Signaling mechanisms in progesterone-neurotransmitter interactions. *Neuroscience* 138, 773–781.
- Mani, S., Portillo, W., 2010. Activation of progesterin receptors in female reproductive behavior: interactions with neurotransmitters. *Front. Neuroendocrinol.* 31, 157–171.
- Mani, S.K., Reyna, A.M., Chen, J.Z., Mulać-Jericević, B., Corneely, O.J.M., 2006. Differential response of progesterone receptor isoforms in hormone-dependent and -independent facilitation of female sexual receptivity. *Mol. Endocrinol.* 20, 1322–1332.
- Masters, D.B., Jordan, F., Beyer, C., Komisaruk, B.R., 1993. Release of amino acids into regional superfusates of the spinal cord by mechano-stimulation of the reproductive tract. *Brain Res.* 621, 279–290.
- Migliaccio, A., Piccolo, D., Castoria, G., Di Domenico, M., Bilancio, A., Lombardi, M., Comi, M., Beato, M., Auricchio, E., 1998. Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J.* 17, 2068–2018.
- Moss, R.L., Foreman, M.M., 1976. Potentiation of lordosis behavior by intrahypothalamic infusion of synthetic luteinizing hormone releasing hormone. *Neuroendocrinology* 20, 176–181.
- Neve, K.A., Seaman, J.K., Trantham-Davidson, H., 2004. Dopamine receptor signaling. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 24, 165–205.
- Paxinos, G., Watson, C. (Eds.), 2008. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, Australia.
- Qiu, M., Lange, C.A., 2003. MAP-kinases couple multiple functions of human progesterone receptors: degradation, transcriptional synergy, and nuclear association. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 85, 147–157.
- Quynner, A., Blaustein, J.D., 2001. A dopamine antagonist blocks vaginocervical stimulation-induced neuronal responses in the rat forebrain. *Brain Res.* 921, 173–182.
- Ramírez-Orduña, J.M., Lima-Hernández, F.J., García-Juárez, M., González-Flores, O., Beyer, C., 2007. Lordosis facilitation by LHRH, PGE<sub>2</sub> or db-cAMP requires activation of the kinase A pathway in estrogen primed rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 86, 169–175.
- Rodríguez-Sierra, J.F., Komisaruk, B.R., 1978. Lordosis induction in the rat by prostaglandin E<sub>2</sub> systemically or intracranially in the absence of ovarian hormones. *Prostaglandins* 15, 513–524.
- Rodríguez-Sierra, J.F., Crowley, W.R., Komisaruk, B.R., 1975. Vaginal stimulation in rats induces prolonged lordosis responsiveness and sexual receptivity. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 89, 79–85.
- Shah, B.H., Farshori, M.P., Jambusaria, A., Catt, K.J., 2003. Role of Src and epidermal growth factor receptor transactivation in transient and sustained ERK1/2 responses to gonadotropin-releasing hormone receptor activation. *J. Biol. Chem.* 278, 19118–19126.
- Shen, T., Horwitz, K.B., Lange, C.A., 2001. Transcriptional hyperactivity of human progesterone receptors is coupled to their ligand-dependent down-regulation by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of serine 294. *Mol. Cell. Biol.* 21, 6122–6131.
- Shi, C.S., Kehrl, J.H., 2004. Pyk2 amplifies epidermal growth factor and c-Src-induced Stat3 activation. *J. Biol. Chem.* 279, 17224–17231.
- Tung, W.H., Hsieh, K.L., Lee, L.Y., Yang, C.M., 2011. Enterovirus 71 modulates a COX-2/PGE<sub>2</sub>/cAMP-dependent viral replication in human neuroblastoma cells: role of the c-Src/EGFR/p42/p44 MAPK/CREB signaling pathway. *J. Cell. Biochem.* 112, 559–570.
- Yun, S.P., Lee, M.Y., Ryu, J.M., Han, H.J., 2009. Interaction between PGE<sub>2</sub> and EGF receptors through MAPKs in mouse embryonic stem cell proliferation. *Cell Mol. Life Sci.* 66, 1603–1616.



Contents lists available at ScienceDirect

## Hormones and Behavior

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yhbeh](http://www.elsevier.com/locate/yhbeh)

## Regular article

Estrogen receptors regulate the estrous behavior induced by progestins, peptides, and prostaglandin E<sub>2</sub>F.J. Lima-Hernández<sup>a,d</sup>, P. Gómora-Arrati<sup>a</sup>, M. García-Juárez<sup>a</sup>, J.D. Blaustein<sup>b</sup>, A.M. Etgen<sup>c</sup>, C. Beyer<sup>a,†</sup>, O. González-Flores<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Centro de Investigación en Reproducción Animal Universidad Autónoma de Tlaxcala-CINVESTAV, Plaza Hidalgo S/N Panotla, Tlaxcala 90740, México<sup>b</sup> Neuroscience and Behavior Program, Center for Neuroendocrine Studies, Tobin Hall, University of Massachusetts, Amherst, MA 01003-9277, USA<sup>c</sup> Dominick P. Purpura Department of Neuroscience, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY 10461, USA<sup>d</sup> Doctorado en Ciencias Naturales del Centro Tlaxcala en Biología de la Conducta

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 28 December 2013

Revised 10 June 2014

Accepted 11 June 2014

Available online 20 June 2014

## Keywords:

ER

Lordosis

Progestins

PGE<sub>2</sub>

GnRH

Leptin

Src kinase

Receptivity

## ABSTRACT

The role of classical estrogen receptors (ERs) in priming female reproductive behavior has been studied previously; however, the participation of this receptor during activation of estrous behavior has not been extensively studied. The purpose of this work was to test the possibility that the facilitation of lordosis behavior in estrogen primed rats by progesterone (P) and its 5 $\alpha$ - and 5 $\beta$ -reduced metabolites, gonadotropin releasing hormone (GnRH), leptin, prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and vagino-cervical stimulation (VCS) involves interactions with classical ERs by using the selective ER modulator, tamoxifen. To further assess the role of ERs, we also explored the effects of the pure ER antagonist, ICI162780 (ICI), on estrous behavior induced by P and GnRH. Ovariectomized, estrogen primed rats (5  $\mu$ g estradiol benzoate 40 h earlier) were injected intravenously with the above mentioned compounds, or they received VCS. All compounds and VCS effectively facilitated estrous behavior when tested at 60, 120 or 240 min after infusion or application of VCS. Intraventricular infusion of tamoxifen (5  $\mu$ g), 30 min before, significantly attenuated estrous behaviors induced in estradiol primed rats by P, most of its 5 $\alpha$ - and 5 $\beta$ -reduced metabolites, GnRH, and PGE<sub>2</sub>, but not by VCS. Although there was a trend for reduction, tamoxifen did not significantly decrease lordosis in females treated with 5 $\beta$ -pregnan-3,20-dione. ICI also inhibited lordosis behavior induced by P and GnRH at some testing intervals. These results suggest that activation of classical ERs participates in the triggering effects on estrous behavior induced by agents with different chemical structures that do not bind directly to ERs.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Introduction

Progestins and some non-steroidal agents, such as gonadotropin-releasing hormone (GnRH; Beyer et al., 1982, 1995; Foreman and Moss, 1977; González-Flores et al., 2006; González-Mantscal and Beyer, 1988; Ramírez-Orduña et al., 2007; Risold and Moss, 1983; Salema and Pfaff, 1980; Wu et al., 2006) and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>; Beyer et al., 1997; Dudley and Moss, 1976; Hall and Lutghe, 1977; Rodríguez-Sierra and Komisaruk, 1977) facilitate lordosis behavior in ovariectomized (ovx) rats primed with estradiol (E<sub>2</sub>). The time course of lordosis facilitation is similar to that induced by progesterone (P; see Morali and Beyer,

1979). None of these agents have affinity for either classical estrogen receptors (ERs) or progesterin receptors (PRs).

Several researchers (Beyer et al., 2003; Blaustein, 2003; Mani et al., 1997) proposed that the PR acts as a common molecular mediator for the various agents that activate lordosis behavior. This idea is supported by the finding that administration of the PR antagonist, RU486, blocks estrous behavior normally induced by P, several ring-A-reduced progestins (Beyer et al., 1995), GnRH, cyclic nucleotides, PGE<sub>2</sub> (Beyer et al., 1997), leptin (García-Juárez et al., 2011), dopamine (Mani et al., 1996), and by vagino-cervical stimulation (VCS; Auger et al., 1997; González-Flores et al., 2008) in ovx rats primed with E<sub>2</sub>. This role of PR as a common molecular mediator in lordosis behavior is unlikely to be due to its classic transcriptional action at the genome, but rather by rapidly activating signaling systems such as protein kinases involved in the expression of female sexual behavior in rats (Beyer et al., 2003; Mani and Portillo, 2010; Mani et al., 1996, 1997).

Recent findings show that the activation of the Src-PR-mitogen-activated protein kinase (MAPK) complex is essential for the facilitation of lordosis behavior by P and other agents (González-Flores et al., 2010;

\* Corresponding author at: Centro de Investigación en Reproducción Animal, Apartado Postal No. 62, Tlaxcala, Tlaxcala CP. 90000, México. Fax: +52 246 46 21727.

E-mail addresses: [oglezlfo@gmail.com](mailto:oglezlfo@gmail.com), [oglezlfo@hotmail.com](mailto:oglezlfo@hotmail.com) (O. González-Flores).

<sup>†</sup> In memoriam.



Lima-Hernández et al., 2012). The mechanism by which P stimulates the Src-MAPK pathway has been well studied in some cells possessing both ER and PR (for review see, Boonyaratanakornkit et al., 2008; Edwards, 2005; Lange, 2004), and many laboratories now suggest that functional c-Src is required for intracellular signaling initiated by both growth factors and steroid hormones. For example, PR through its N-terminus binds directly to SH3 domains in c-Src and associates via the N-terminal with ER, whereas ERs interact with the SH2-domain of c-Src (Ballare et al., 2003; Boonyaratanakornkit et al., 2001; Migliaccio et al., 2007). These interactions are required for Src-MAPK activation by progestins and estrogens (Boonyaratanakornkit et al., 2001; Faivre et al., 2005; Migliaccio et al., 1998) in that the anti-progestin RU486 and anti-estrogens, such as tamoxifen and ICI182780, inhibit steroid stimulation of the Src-MAPK complex.

In the present study we hypothesized that the classical ER participates in the facilitation of lordosis not only by P, as was reported by several workers in rodents (Etgen, 1979; Kow and Pfaff, 1975; Micevych and Sinchak, 2013), but also by ring A-reduced progestins, by non-steroidal agents such as GnRH, PGE<sub>2</sub> and leptin, and by VCS. For this purpose, an infusion of tamoxifen, an agent that has a mixed agonist/antagonist action at ERs, or the pure ER antagonist ICI182780 (ICI) was administered intracerebroventricularly (icv) shortly before application of VCS or infusion of agents that facilitate lordosis.

## Material and methods

### Animals and surgeries

We used a total of 194 Sprague-Dawley female rats (240–280 g body weight), bred in our colony in Tlaxcala, Mexico. They were maintained under controlled temperature (23 ± 2 °C) and light conditions (14:10 L:D) with Purina rat chow and water provided ad libitum. Rats were bilaterally ovx under anesthesia with xylazine (4 mg/kg) and ketamine (80 mg/kg) and housed in acrylic cages in groups of four. Two weeks after ovariectomy, the females were anesthetized with xylazine and ketamine, placed in a Kopf stereotaxic instrument (Tujunga, CA), and implanted with a 22 gauge stainless steel guide cannula (Plastics One, Roanoke, VA) into the right lateral ventricle following coordinates from the atlas of Paxinos and Watson (2006) (A/P + 0.80 mm, M/L – 1.5 mm, D/V – 3.5 mm with respect to the bregma). A stainless steel screw was fixed to the skull, and both cannula and screw were attached to the bone with dental cement. A 30 gauge insert cannula provided with a cap was introduced into the guide cannula to prevent clogging and contamination. Females in which infusions missed the ventricle were excluded from the study. All subjects received an antibiotic (penicillin 22,000 IU/kg) and an anesthetic (lidocaine 5%) for three days after surgery. Animal care and all the experimental procedures adhered to NIH guidelines and the Mexican Law for the Protection of Animals.

### Drugs

E<sub>2</sub> benzoate (E<sub>2</sub>B), P, 5 $\alpha$ -pregnan-3,20-dione (5 $\alpha$ -DHP), 5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-one (5 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -Pgl), 5 $\beta$ -pregnan-3,20-dione (5 $\beta$ -DHP), 5 $\beta$ -pregnan-3 $\beta$ -ol-20-one (5 $\beta$ ,3 $\beta$ -Pgl), GnRH, PGE<sub>2</sub>, leptin (rat recombinant, purity of >97%), ICI (7 $\alpha$ -[9-(4,4,5,5-pentafluoropentylsulfonyl) nonyl]estra-1,3,5-(10)-triene-3,17 $\beta$ -diol) and tamoxifen were purchased from Sigma Chemical, Inc. (St. Louis, MO). It should be noted that tamoxifen did not produce generalized behavioral suppression, and this compound has been widely used in studies of female sexual behavior. Moreover, it has been reported that tamoxifen can function as a neuroprotectant against methamphetamine-induced neurotoxicity in females (Dluzen and Mickle, 2005). In that study, tamoxifen increased

several locomotor behaviors, such as horizontal activity, number of movements and total distance traveled.

## Experiment 1

### Effect of tamoxifen on estrous behavior induced by P and 5 $\alpha$ - and 5 $\beta$ -reduced progestins

This experiment was performed to assess the participation of ERs in estrous behavior induced by progestins with a variety of structures. One week after cannula placement, all females were injected s.c. with 5  $\mu$ g of E<sub>2</sub>B. At 39.5 h after E<sub>2</sub>B either tamoxifen or oil vehicle was infused, and 40 h after E<sub>2</sub>B progestins were infused. All compounds were infused icv in a volume of 1  $\mu$ l delivered through a plastic catheter (Clay Adams; PE 10 No. 7401) fitted to a Hamilton syringe (10  $\mu$ l) inserted into the guide cannula. Progestins and tamoxifen were dissolved in sesame oil and injected at the following doses: 130 ng for P (n = 8), 5 $\beta$ -DHP (n = 8) and 5 $\beta$ ,3 $\beta$ -Pgl (n = 8) and 13 ng for 5 $\alpha$ -DHP (n = 8) and 5 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -Pgl (n = 9). These doses were selected from dose-response curves previously established in our laboratory (González-Flores et al., 2006). Other groups of females were injected icv at 39.5 h after E<sub>2</sub>B with 5  $\mu$ g of tamoxifen and 30 min later received the following progestins: 130 ng of P (n = 9), 5 $\beta$ -DHP (n = 9) and 5 $\beta$ ,3 $\beta$ -Pgl (n = 9) and 13 ng of 5 $\alpha$ -DHP (n = 11) and 5 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -Pgl (n = 9). The dose of tamoxifen was selected from previous studies showing its effectiveness for interfering with ER activation (McKenna et al., 1992).

## Experiment 2

### Effect of tamoxifen on estrous behavior induced by GnRH and leptin

This experiment was performed to assess the participation of ER in estrous behavior induced by GnRH and leptin. One week after cannula placement, all females were injected s.c. with 5  $\mu$ g of E<sub>2</sub>B and 39.5 h later received an icv infusion of vehicle (oil) followed at 40 h by icv GnRH or leptin as described in Experiment 1. GnRH was dissolved in distilled water and injected at a concentration of 50 ng/1  $\mu$ l (n = 9). Leptin (1 mg) was initially dissolved in 111  $\mu$ l of Tris (10 mM, pH = 8). From this original concentration, dilutions were made to obtain the selected leptin dose of 3  $\mu$ g/1  $\mu$ l (n = 8). The doses of both drugs were selected from previous studies in our laboratory (García-Juárez et al., 2011). Other groups of females were injected icv at 39.5 h after E<sub>2</sub>B with 5  $\mu$ g of tamoxifen and 30 min later received 50 ng/1  $\mu$ l of GnRH (n = 9) or 3  $\mu$ g/1  $\mu$ l of leptin (n = 10).

## Experiment 3

### Effect of tamoxifen on estrous behavior induced by PGE<sub>2</sub> and VCS

This experiment was performed to assess the participation of ERs in estrous behavior induced by PGE<sub>2</sub> and VCS. One week after cannula placement, all females in the PGE<sub>2</sub> groups were injected s.c. with 5  $\mu$ g of E<sub>2</sub>B, and 39.5 h later, some rats received vehicle (oil, n = 8) or tamoxifen (n = 9). At 40 h after E<sub>2</sub>B, rats received icv infusions of PGE<sub>2</sub> as described in Experiment 1. PGE<sub>2</sub> was injected at a concentration of 1  $\mu$ g/1  $\mu$ l of saline. Forty hours after E<sub>2</sub>B injection and 30 min after infusion of vehicle (oil), 9 females received VCS (a 150-g force applied against the cervix using a glass plunger from a 1 ml syringe inserted intra-vaginally). The VCS was applied either alone or concurrently with manual flank stimulation (palpations applied with the finger and thumb to both flanks and with the palm of the hand to the perineal area). Either form of stimulation was applied for 5 s. Other females were injected icv at 39.5 h after E<sub>2</sub>B with 5  $\mu$ g of tamoxifen and 30 min later received VCS (n = 9).



#### Experiment 4

##### Effect of ICI, a pure ER antagonist, on estrous behavior induced by P and GnRH

This experiment was conducted to confirm that estrous behavior induced by P and GnRH, which have similar capabilities to induce lordosis in estrogen-primed female rats, is through the activation of ERs. We used the pure ER antagonist, ICI, because it has little or no agonist activity and competitively inhibits estradiol binding to the ER with a binding affinity that is 89% that of estradiol (Wakeling and Bowler, 1987). One week after cannula placement, all females were injected s.c. with 5 µg of E<sub>2</sub>B and 39.5 h later, 100 µg of ICI or vehicle was injected icv. Thirty minutes after ICI or vehicle administration, 130 µg of P (n = 9) or 50 ng of GnRH (n = 9) was injected icv.

#### Testing procedures

Tests for sexual behaviors (receptivity and proceptivity) were conducted by placing females in a circular Plexiglas arena (53 cm diameter) with a sexually active male. Tests were conducted during the dark phase of the light-dark cycle. The lordosis quotient [LQ = (number of lordosis / 10 mounts) × 100] was used to assess receptive behavior. Proceptivity was evaluated by determining the incidence of hopping, darting and ear-wiggling during the entire receptivity test. We considered an animal proceptive when two of these behaviors were expressed during the testing period. This criterion was used because in the Sprague-Dawley rats that were used, only a small proportion of animals display the three proceptive behaviors together. Behavioral tests were conducted at 60, 120 and 240 min after administration of experimental agents or VCS, and the test ended when the female received 10 mounts from the male.

#### Verification of injection sites

One day after the behavioral test, rats were deeply anesthetized with ether, and 1% methylene blue was administered through the cannula. The brain was removed and sectioned in the transverse plane to check the cannula position in the lateral ventricle. Any rat whose cannula was not in the ventricle was discarded from the study.

#### Statistical analysis

The effect of tamoxifen on the behavioral action of hormones and VCS was assessed by comparing the LQs obtained with these agents alone versus those obtained when tamoxifen was also administered. To compare the effects of tamoxifen as a function of the time after hormone and VCS administration, we used a Friedman two-way (F) test. Because the distribution of LQ values in some groups was not normal, a Wilcoxon-Mann-Whitney U test was used to compare two independent groups at the different times tested (Siegel and Castellan, 1995). This test is an excellent alternative to the t-test with a power efficiency of 95.5% of the parametric test. The multiple chi square was used to compare proportions of proceptive animals among groups, followed when appropriate by a Fisher's exact probability test to compare the proportion of proceptive females among experimental and control groups at specific time points (Siegel and Castellan, 1995). We also carried out effect size calculations (Berben et al., 2012) for testing differences in mean LQ scores between females treated with different agents or VCS and those who received the treatment plus tamoxifen or ICI. We report Cohen's *d* for interpreting effect sizes for the standardized mean differences.

#### Results

##### Experiment 1

##### Tamoxifen reduces lordosis and proceptivity induced by P and most of its 5α- and 5β-reduced metabolites

The Friedman test shows statistically significant differences among groups that received progesterin alone or progesterin plus tamoxifen at the three times tested (P, F = 21, df = 5, p < 0.001; 5α-DHP, F = 31, df = 5, p < 0.001; 5β-DHP, F = 12.7, df = 5, p < 0.02). In females administered P, tamoxifen inhibited lordosis significantly at 120 (p < 0.01) and 240 min (p < 0.01) after progesterin injection. Tamoxifen significantly decreased LQ scores in animals infused with 5α-DHP at 60 (p < 0.05), 120 (p < 0.01) and 240 min (p < 0.01) (Fig. 1A). Effect sizes are reported in Table 1 and confirm that tamoxifen was most effective at inhibiting lordosis behavior during the 60 and 120 min tests. The three progesterins also induced proceptive behavior in most females; maximal proceptivity was observed at 120 min with 5β-DHP (Fig. 1B) and at 240 min with P and 5α-DHP. Tamoxifen suppressed the proceptive behaviors induced by P (p < 0.01) and 5α-DHP (0.05) at the 120 and 240 min tests (Fig. 1B; p < 0.01 for both progesterins), but did not affect proceptivity induced by 5β-DHP.

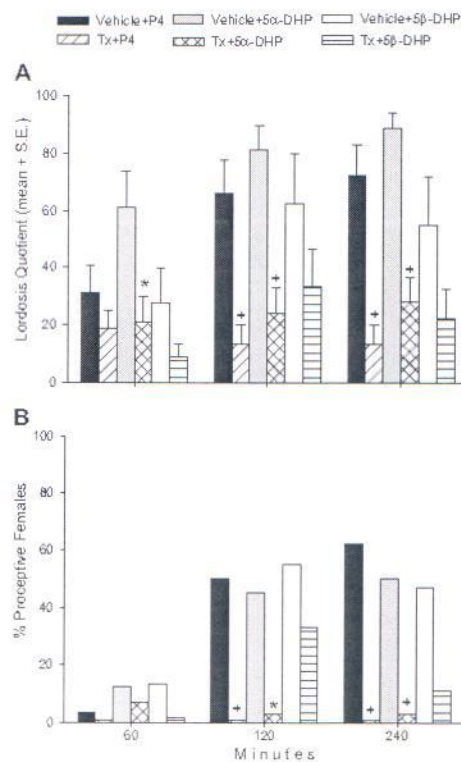


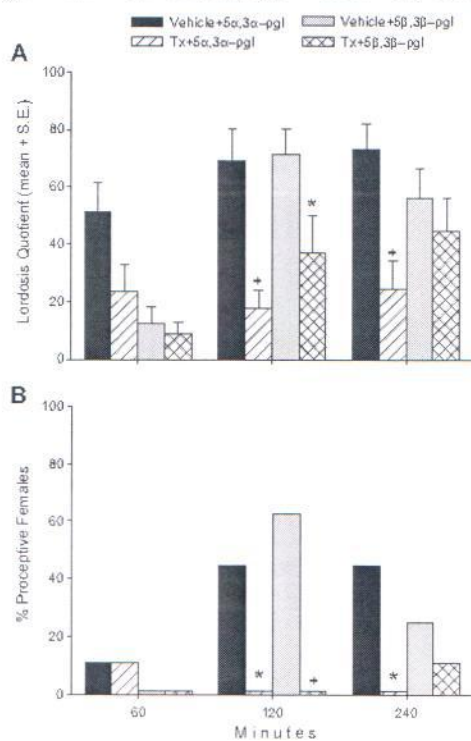
Fig. 1. Induction of lordosis (A) and proceptive (B) behaviors in E<sub>2</sub>-primed rats by icv infusion of 130 ng of P (n = 8) and 5β-DHP (n = 8) and of 13 ng of 5α-DHP (n = 8). Icv administration of 5 µg of tamoxifen (TMX) antagonized estrous behavior induced by P (n = 9), 5β-DHP (n = 14) and 5α-DHP (n = 11). \*P < 0.01, \*P < 0.05 vs corresponding group receiving vehicle plus progesterin.

**Table 1**  
Effect sizes for lordosis behavior in Experiments 1–4.

| Experiment | Treatment   | Effect size (d) at the three test times, min |     |     |
|------------|---|--|-----|-----|
|            |   | 60   | 120 | 240 |
| 1          | P + Tx vs P   | 0.2  | 0.7 | 0.7 |
|            | 5 $\alpha$ -DHP + Tx vs 5 $\alpha$ -DHP                         | 0.5  | 0.7 | 0.8 |
|            | 5 $\beta$ -DHP + Tx vs 5 $\beta$ -DHP                           | 0.2  | 0.3 | 0.3 |
|            | 5 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -Pgl + Tx vs 5 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -Pgl | 0.4  | 0.6 | 0.6 |
|            | 5 $\beta$ ,3 $\beta$ -Pgl + Tx vs 5 $\beta$ ,3 $\beta$ -Pgl     | 0.1  | 0.5 | 0.2 |
| 2          | GnRH + Tx vs GnRH   | 0.2  | 0.8 | 0.2 |
|            | Leptin + Tx vs Leptin   | 0.4  | 0.6 | 0.3 |
| 3          | PGE <sub>2</sub> + Tx vs PGE <sub>2</sub>                       | 0.1  | 0.9 | 0.5 |
|            | VCS + Tx vs VCS   | 0.2  | 0.3 | 0.2 |
| 4          | P + ICI vs P  | 0.2  | 0.5 | 0.5 |
|            | GnRH + ICI vs GnRH  | 0.3  | 0.8 | 0.3 |

P, progesterone; Tx, tamoxifen; 5 $\alpha$ -DHP, 5 $\alpha$ -pregnan-3,20-dione; 5 $\beta$ -DHP, 5 $\beta$ -pregnan-3,20-dione; 5 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -Pgl, 5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-one; 5 $\beta$ ,3 $\beta$ -Pgl, 5 $\beta$ -pregnan-3 $\beta$ -ol-20-one; GnRH, gonadotropin-releasing hormone; PGE<sub>2</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>; VCS, vaginal-cervical somatization; ICI, ICI182780.

The Friedman test also showed statistically significant differences among rats that received pregnanolones (5 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -Pgl and 5 $\beta$ ,3 $\beta$ -Pgl) alone or in combination with tamoxifen at the times tested (5 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -Pgl,  $F = 15$ ,  $df = 5$ ,  $p < 0.01$ ; 5 $\beta$ ,3 $\beta$ -Pgl,  $F = 19.9$ ,  $df = 5$ ,  $p < 0.001$ ).



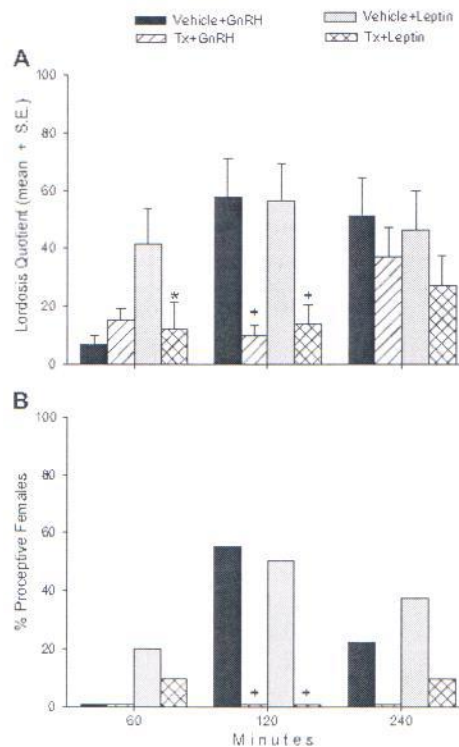
**Fig. 2.** Induction of lordosis (A) and proceptive (B) behaviors in E<sub>2</sub>-primed rats by icv infusion of 13 ng of 5 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -Pgl ( $n = 9$ ) and 5 $\beta$ ,3 $\beta$ -Pgl ( $n = 9$ ). Icv administration of 5  $\mu$ g of tamoxifen (TMX) antagonized estrous behavior induced by 5 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -Pgl ( $n = 9$ ) and 5 $\beta$ ,3 $\beta$ -Pgl ( $n = 9$ ). \* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$  vs corresponding group receiving the combination of vehicle plus using A reduced progesterin.

Thus, Fig. 2A shows that icv infusion of 13 ng of 5 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -Pgl facilitated lordosis at 60 min and its action continued until 240 min, whereas 5 $\beta$ ,3 $\beta$ -Pgl induced clear lordosis behavior only at 120 and 240 min. Tamoxifen significantly reduced the lordosis behavior induced at 120 min by both 5 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -Pgl ( $p < 0.01$ ) and 5 $\beta$ ,3 $\beta$ -Pgl ( $p < 0.05$ ). Lordosis induced at 240 min by 5 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -Pgl was also inhibited by tamoxifen ( $p < 0.01$ ). Effect sizes are reported in Table 1 and confirm that tamoxifen was most effective at inhibiting lordosis behavior induced for 5 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -Pgl during the 120 and 240 min tests, and effect sizes were smallest for 5 $\beta$ ,3 $\beta$ -Pgl. The two pregnanolones also induced clear proceptive behavior at 120 min in most females (Fig. 2B), although the proceptivity induced by 5 $\beta$ ,3 $\beta$ -Pgl is low at 240 min. Tamoxifen significantly reduced the proceptive behavior induced by 5 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -Pgl at 120 ( $p < 0.05$ ) and 240 min ( $p < 0.05$ ) and the proceptivity induced by 5 $\beta$ ,3 $\beta$ -Pgl only at 120 min ( $p < 0.01$ ).

#### Experiment 2

##### Tamoxifen reduces lordosis and proceptivity induced by GnRH and leptin

Fig. 3A shows the lordosis behavior induced by 50 ng of GnRH and by 3  $\mu$ g of leptin administered icv. The Friedman test showed statistically significant differences between animals that received these peptides alone or in combination with tamoxifen at the times tested



**Fig. 3.** Induction of lordosis (A) and proceptive (B) behaviors in E<sub>2</sub>-primed rats by icv infusion of 50 ng of GnRH ( $n = 9$ ) and 3  $\mu$ g of leptin ( $n = 8$ ). Icv administration of 5  $\mu$ g of tamoxifen (TMX) antagonized estrous behavior induced by GnRH ( $n = 9$ ) and leptin ( $n = 10$ ). \* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$  vs corresponding group receiving the combination of vehicle plus peptide.



(GnRH,  $F = 19.5$ ,  $df = 5$ ,  $p < 0.002$ ; leptin,  $F = 14$ ,  $df = 5$ ,  $p < 0.01$ ). At 120 min after GnRH infusion the group receiving tamoxifen in combination with GnRH exhibited significantly less lordosis than that given GnRH alone ( $p < 0.01$ ), and tamoxifen also inhibited the proceptivity induced at this time ( $p < 0.01$ ) (Fig. 3B). Leptin-injected females expressed statistically significant lordosis behavior at all three time intervals. Tamoxifen reduced lordosis behavior induced by leptin at 60 ( $p < 0.05$ ) and 120 min ( $p < 0.01$ ). Rats also displayed proceptive behaviors following leptin administration, and these were reduced significantly by tamoxifen at 120 min ( $p < 0.01$ ). Effect sizes confirm that tamoxifen was most effective at inhibiting lordosis behavior for both peptides during the 120 min tests (Table 1).

**Experiment 3**

*Tamoxifen reduces lordosis and proceptivity induced by PGE<sub>2</sub> but not by VCS*

The Friedman test shows statistical differences between groups that received the PGE<sub>2</sub> and VCS and these combined with tamoxifen at the three times tested (PGE<sub>2</sub>,  $F = 18$ ,  $df = 5$ ,  $p < 0.002$ ; VCS,  $F = 11.6$ ,  $df = 5$ ,  $p < 0.039$ ). However, both PGE<sub>2</sub> and VCS induced low levels of lordosis behavior at 60 min (Fig. 4A) and did not induce proceptivity at

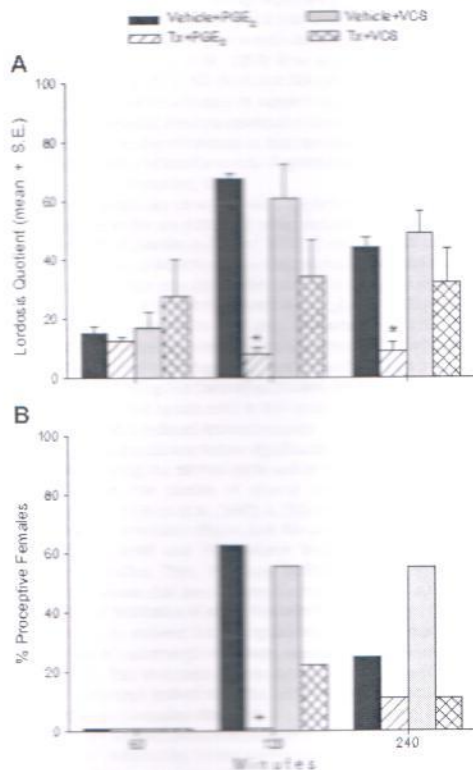


Fig. 4. Induction of lordosis (A) and proceptive (B) behavior in E<sub>2</sub>-primed rats by i.c.v. infusion of 1 µg of PGE<sub>2</sub> (n = 8) and vagus-nerve-stimulation (VCS, n = 9). I.c.v. administration of 5 µg of tamoxifen (Tx) antagonized lordosis behavior induced by PGE<sub>2</sub> (n = 9) but not VCS (n = 9). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs corresponding group receiving the combination of vehicle plus PGE<sub>2</sub> or VCS.

this time (Fig. 4B). The highest lordosis quotient was observed at 120 min with both treatments, a time at which PGE<sub>2</sub> produced slightly higher levels of proceptivity than VCS. Estrous behavior decreased at 240 min postinjection of PGE<sub>2</sub> and application of VCS. I.c.v. administration of tamoxifen significantly reduced the lordosis behavior induced by PGE<sub>2</sub> at 120 ( $p < 0.01$ ) and 240 min ( $p < 0.05$ ). Effect sizes confirm that tamoxifen was most effective at inhibiting lordosis behavior for PGE<sub>2</sub> during the 120 min tests (Table 1). However, lordosis behavior induced by VCS was not reduced significantly by tamoxifen. These results are consistent with the effect sizes shown in Table 1. Proceptive behavior induced by PGE<sub>2</sub> was completely abolished by tamoxifen at 120 min ( $p < 0.01$ ); however, tamoxifen had no significant effect on proceptivity induced by VCS.

**Experiment 4**

*ICI reduces lordosis and proceptivity induced by P and GnRH*

As shown in Fig. 5A, the Friedman test showed statistically significant differences among animals that received P or GnRH alone or in combination with tamoxifen at the times tested ( $P$ ,  $F = 15.7$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0.001$ ; GnRH,  $F = 12.1$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0.01$ ). Central administration of 100 µg of ICI 30 min before 130 ng of P or 50 ng of GnRH inhibited lordosis behavior induced by these agents at 120 min ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively) and also inhibited the effect of P at 240 min ( $p < 0.05$ ). Effect sizes were greatest at the 120 min test for GnRH and

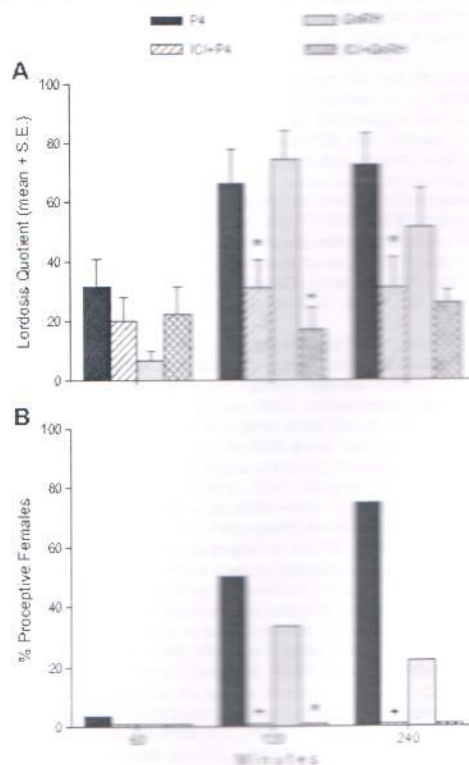


Fig. 5. Induction of lordosis (A) and proceptive (B) behavior in E<sub>2</sub>-primed rats by i.c.v. infusion of 130 ng of P or 50 ng of GnRH. Administration of 100 µg of ICI 2780 (ICI) antagonized estrous behavior induced by P (n = 8) and GnRH (n = 9). \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$  vs corresponding group receiving the combination of ICI and P or GnRH.



more moderate at the 120 and 240 min tests for P (Table 1), while for P the largest effect size was at the 120 minute test, continuing to 240 min. Proceptivity (Fig. 5B) induced by P and GnRH was also significantly suppressed by ICI at 120 ( $p < 0.01$  and  $0.05$ , respectively), and at 240 min tamoxifen also decreased proceptivity induced by P ( $p < 0.01$ ).

## Discussion

Estrous behavior in ovx rats, as in nearly all mammalian species, can be stimulated by repeated administration of low doses of estrogens alone ( $E_2$ , estrone, estradiol; Beyer et al., 1982; Larsson et al., 1976) for several days (e.g., 5 to 7). This process operates *in vivo* in conditions of persistent estrus induced by age or by continuous illumination in rats (Takeo, 1984). However, in gonadally intact rats undergoing natural estrous cycles, estrous behavior is regulated in its level and duration by other hormones such as P. This condition is reproduced in ovx rats by giving an initial priming injection of an estrogen followed by P at least 20 h later. The present results show that the concurrent *in vivo* infusion of the ER modulator tamoxifen significantly attenuates lordosis behavior and proceptivity induced by most progestins, GnRH,  $PGE_2$ , and leptin but not by VCS. The results are consistent with previous reports by Feder and Morin (1974) and Blaustein and Feder (1979) that an anti-estrogen administration near the time of P injection can prevent the facilitatory effect of P on lordosis in estrogen-primed guinea pigs and rats. These findings strongly suggest the participation of classical ERs in estrous behavior elicited by these compounds many hours after the priming injection of  $E_2$  (Hartan et al., 1983; Kow and Pfaff, 1975, 1998; Mitevych and Dewing, 2011; Mitevych and Sinchak, 2013) and suggest that classical ERs must be activated to support the display of maximal levels of estrous behavior. Previous results also showed that the PR is essential for the expression of lordosis in that the antiprogesterin, RU486, inhibits the facilitatory effect of a variety of agents besides P (pregnanes, GnRH,  $PGE_2$ , leptin, dopamine, VCS).

The present results are consistent with the fact that during natural estrous cycles,  $E_2$  levels are quite high when rats are in behavioral estrus (Powers, 1970; Zelman and Adler, 1977). Thus, in normal circumstances, ERs are likely to be activated by endogenous  $E_2$  around the time of facilitation by P. This may also be the case in ovx rats, because low levels of  $E_2$  remaining after systemic injections of  $E_2$  in ovx rats provide low levels of ER activation up to 48 h later (Schwartz et al., 1979). This low level of ER activation may be sufficient to permit further activation by different agents such as progestins, peptides and  $PGE_2$ . This idea is supported by the finding that tamoxifen blocked the lordosis behavior induced by most of the agents used in this study and because ICI also blocked P- and GnRH-induced estrous behavior.

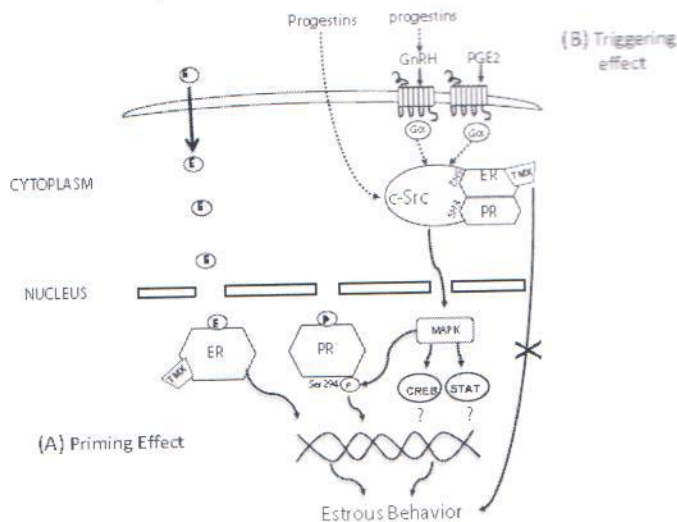
Notably, tamoxifen did not reduce significantly lordosis behavior induced by VCS. During the estrous cycle and in ovx, hormone-treated rats, VCS induces the release of several neurotransmitters and neuromodulators (Masters et al., 1993) in CNS areas that regulate various reproductive processes (Etgen and Morales, 2002). Such compounds include GnRH and  $PGE_2$  whose behavioral effects were blocked by tamoxifen. Thus, VCS may facilitate lordosis behavior through a mechanism that does not rely on the presence of activated ERs at the time of facilitation of sexual behavior by this stimulus. For example, we recently showed that endogenously released norepinephrine, acting via  $\alpha_1$ -adrenergic receptors, mediates the facilitation of lordosis by VCS. This observation is consistent with a mechanism involving  $\alpha_1$ -adrenergic activation of the nitric oxide/cGMP/protein kinase G pathway (González-Flores et al., 2007). However, further experiments are needed to determine whether tamoxifen blocks estrous behavior induced by either norepinephrine or nitric oxide. Nonetheless, VCS may eventually engage similar downstream signaling mechanisms as progestins, peptides and  $PGE_2$  because the PR antagonist RU486 and several kinase inhibitors can block VCS-facilitated lordosis (Gómora-Arriati et al., 2008; González-Flores et al., 2008; Lima-Hernández et al., 2012).

The mechanism through which ERs stimulate estrous behaviors in estrogen-primed rats by diverse agents, such as progestins, GnRH, leptin, dopamine and  $PGE_2$ , is not yet clear. Fig. 6 illustrates some of the well-established actions of the ER-PR-Src-MAPK complex that might be related to the stimulation of estrous behavior. Although we cannot exclude the possibility that ERs acting on the genome, typically activated by  $E_2$ , are essential for both early and late stages of the behavioral response elicited by each of these compounds, we suggest an alternative mechanism. Perhaps  $E_2$  activates two temporally and mechanistically distinct processes controlled by ERs (see Fig. 6). First is a priming effect in which  $E_2$  administered to ovx rats binds to classical nuclear ERs. The hormone-receptor complex then activates transcriptional machinery associated with the DNA, thereby inducing the synthesis of a variety of proteins such as the PR (MacLusky and McEwen, 1978; Mogilwsky and Raynaud, 1979) and ER (Castles et al., 1997; Robertson et al., 2002). Second is a triggering effect in which unliganded ER and PR are activated by phosphorylation and rapidly shuttle between the nucleus and cytoplasm and interact with Src tyrosine kinase. ERs are believed to associate with c-Src by interaction of phosphotyrosine-537 in the ER ligand binding domain with the SH2 domain, whereas PRs, through amino acids 421 and 428 in the N-terminal, bind with the SH3 domain of Src, promoting the Src-Raf-MAPK phosphorylation cascade. The activation of this trimer, i.e., ER-PR-Src, can occur by binding of natural ligands such as  $E_2$  and P or by non-steroidal agents (Boonyaratankornkit et al., 2008; Chen et al., 2009, 2010; Lima-Hernández et al., 2012; Migliaccio et al., 1998, 2007). This trimer can form in some cells expressing both ERs and PRs, including presumably in neurons that regulate estrous behavior (Balleine et al., 1999; Gréco et al., 2001; Järvinen et al., 2000).

Physical and functional interactions between ERs and PRs that occur in the cytoplasm have been described (Ballare et al., 2003; Boonyaratankornkit et al., 2001; Hagan et al., 2009; Migliaccio et al., 1998). Triggering hormones like P, GnRH, and  $PGE_2$  could activate the Src-MAPK pathways associated with the ER-PR dimer, thereby rapidly inducing estrous behavior via non-genomic mechanisms. This idea is supported by results obtained in our laboratory, in which the antiprogesterin, RU486, as well as inhibitors of MAPK and Src (PD98059 and PP2, respectively) inhibit lordosis and proceptivity in ovx,  $E_2$ -primed rats induced by compounds with diverse chemical structures, including ring A reduced progestins, GnRH, and  $PGE_2$ , as well as by VCS (Beyer et al., 1995, 1997; Etgen and Barfield, 1986; González-Flores et al., 2004, 2008, 2009, 2010; Lima-Hernández et al., 2012).

Support for this model also comes from experiments using anti-estrogenic compounds. Thus, tamoxifen and ICI, administered at the time of estrogen priming, reduce lordosis behavior induced by P (Etgen, 1979; Etgen and Shamamian, 1986). Similar results were obtained when the antiestrogens were given at the time of P administration (Blaustein and Feder, 1979). In T47D breast cancer cells, MAPK activation by a synthetic progestin was blocked following treatment with anti-estrogens (Migliaccio et al., 1998). This group proposed that ERs are required for the interaction of PRs with c-Src, as well as for the subsequent activation of MAPK. Furthermore, the lordosis behavior induced by several agents, such as progestins and  $PGE_2$ , could be induced indirectly through GnRH release from the hypothalamus, without activating the ER, but modulating a membrane receptor, the GnRH-1 subtype. This receptor activates the G $\alpha$ s protein to stimulate cAMP formation and thus induce lordosis behavior (Beyer et al., 1982; Fernández-Guasti et al., 1983; Whalen and Lauber, 1986) or can also activate the Src-MAPK cascade (Shah et al., 2003). In support of this idea, we recently showed that the estrous behavior induced by ring A reduced progestins and VCS was inhibited by the GnRH-1 receptor antagonist antide (Gómora-Arriati et al., 2008).

Although it is possible that ERs, activated by  $E_2$  many hours earlier, mediate short-term facilitation of lordosis, our results suggest a new model whereby ERs contribute to the activation of estrous behavior by several compounds with different chemical structures. We propose that interactions among several molecules (ER, PR, Src, MAPK, etc.) in



**Fig. 6.** Diagram of the possible mechanisms of action through which progesterins, GnRH, and PGE<sub>2</sub> activate the ER-Src system to elicit estrous behaviors in ovariectomized, E<sub>2</sub>-primed rats. (A) Priming effect: E<sub>2</sub>, through binding the ER induces genomic effects (left side below). (B) Triggering effect: Ring A reduced progesterins, GnRH, and PGE<sub>2</sub> act on a membrane receptor to activate second messenger-regulated serine/threonine kinases. Src signaling through the MAPK system occurs in the context of a multiprotein complex in which the ER and PR act as a scaffold to recruit an assortment of enzymatic effectors. Activation of the Src-MAPK system results in rapid and transient membrane effects as well as delayed genomic effects mediated through proteins like cAMP-responsive element binding protein (CREB) or signal transducers and activators of transcription (STATs), which modulate gene transcription. Both priming and triggering effects of ER can be inhibited by tamoxifen and ICI.

the cell cytoplasm may play an important role for integration of internal and external stimuli that trigger and maintain female sexual behavior. Further studies, however, are required to determine if triggering effects mediated by ER activation by agents without affinity for ER are mediated through this alternate pathway.

**Acknowledgments**

The authors gratefully acknowledge the technical assistance of Guadalupe Domínguez-López. This work was supported by CONACYT/134291 and by CACYM UAT-2014.

**References**

Anger, A.P., Moffat, C.A., Blaustein, J.D., 1997. Progesterone-independent activation of rat brain progesterin receptors by reproductive stimuli. *Endocrinology* 138, 511–514.  
 Ballarín, C., Ufmg, M., Bechtold, T., Sancho, E., DiDomercio, M., Migliaccio, A., Anrichio, F., Besto, M., 2003. Two domains of the progesterone receptor interact with the estrogen receptor and are required for the progesterone activation of the c-Src/Erk pathway in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 23, 1994–2008.  
 Ballarín, E.L., Hurs, S.M., Clarke, C.L., 1999. Coexpression of alternatively spliced estrogen and progesterone receptor transcripts in human breast cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 1370–1377.  
 Berben, L., Sereika, S.M., Engberg, S., 2012. Effect size estimation: methods and examples. *Int. J. Nurs. Stud.* 49, 1039–1042.  
 Beyer, C., Gomara, P., Candola, E., Sandoval, Y., 1982. Pharmacological evidence that GnRH action on lordosis behavior is mediated through a site on GnRH. *Horm. Behav.* 16, 107–112.  
 Beyer, C., González-Flores, O., González-Marraco, G., 1995. Ring A reduced progesterone potently stimulate estrous behavior in rats: paradoxical effect through the progesterone receptor. *Physiol. Behav.* 58, 985–993.  
 Beyer, C., González-Flores, O., González-Marraco, G., 1997. Progesterone receptor participates in the stimulatory effect of LH/EH, prostaglandin E<sub>2</sub>, and cyclic AMP on lordosis and proceptive behavior in rats. *J. Neuroendocrinol.* 9, 609–614.  
 Beyer, C., González-Flores, O., García-Juárez, M., González-Marraco, G., 2002. Non-ligand activation of estrous behavior in rodents: cross-talk at the progesterone receptor. *Scand. J. Psychol.* 44, 221–229.

Blaustein, J.D., 2003. Progesterin receptors: neuronal integrators of hormonal and environmental stimulation. *Annu. N. Y. Acad. Sci.* 1007, 238–250.  
 Blaustein, J.D., Feder, H.H., 1979. Cytoplasmic progesterin receptors in female guinea pig brain and their relationship to refractoriness in expression of female sexual behavior. *Brain Res.* 177, 489–498.  
 Boonyaratanalomlüt, V., Scott, M., Ribon, V., Sherman, L., Anderson, S., Miller, J., Miller, W., Edwards, D.A., 2001. Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinase. *Mol. Cell* 8, 269–280.  
 Boonyaratanalomlüt, V., Bi, Y., Rudd, M., Edwards, D.P., 2008. The role and mechanism of progesterone receptor activation of extra-nuclear signaling pathways in regulating gene transcription and cell cycle progression. *Steroids* 73, 922–928.  
 Cantley, C.G., Oesterreich, S., Hansen, R., Fuqua, S.A., 1997. Auto-regulation of the estrogen receptor promoter. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 62, 155–163.  
 Chen, J., An, B.S., Cheng, L., Hammond, G.L., Leung, P.C., 2009. Gonadotropin-releasing hormone-mediated phosphorylation of estrogen receptor- $\alpha$  contributes to fosB expression in mouse gonadotrophs. *Endocrinology* 150, 4583–4593.  
 Chen, J., An, B.S., So, W.K., Cheng, L., Hammond, G.L., Leung, P.C., 2010. Gonadotropin-releasing hormone-1-mediated activation of progesterone receptor contributes to gonadotropin  $\alpha$ -subunit expression in mouse gonadotrophs. *Endocrinology* 151, 1204–1211.  
 Dixon, D.E., Michley, K.R., 2005. Gender differences in modulatory effects of tamoxifen upon the nigrostriatal dopaminergic system. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 80, 27–33.  
 Dudley, C.A., Mott, R.L., 1976. Facilitation of lordosis in the rat by prostaglandin E<sub>2</sub>. *J. Endocrinol.* 71, 457–458.  
 Edwards, D.P., 2005. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu. Rev. Physiol.* 67, 335–376.  
 Egan, A.M., 1979. Antiestrogenic effects of tamoxifen, toremifene, and CI-628 on sexual behavior, cytoplasmic receptors, and nuclear binding of estrogen. *Horm. Behav.* 13, 97–112.  
 Egan, A.M., Barfield, E.J., 1984. Amputation of female sexual behavior with intracerebral implants of antiestrogenic ER 36436: correlation with binding to neural progesterin receptors. *Endocrinology* 115, 1610–1617.  
 Egan, A.M., Muzina, J.L., 2002. Gonadotrophic stimuli evoke norepinephrine release in the anterior ventromedial hypothalamus of sexually receptive female rats. *J. Neuroendocrinol.* 14, 213–220.  
 Egan, A.M., Shummeton, P., 1984. Regulation of estrogen-stimulated lordosis behavior and hypothalamic progesterone receptor induction by antiestrogens in female rats. *Horm. Behav.* 28, 186–190.  
 Evers, S., Williams, A., Newton-Walker, L., Lango, C.A., 2005. Integration of progesterone receptor-mediated signaling and nuclear actions in breast cancer cell models: role of estrogen-activated protein kinases and cell cycle regulators. *Steroids* 70, 413–425.



- Fedez, H.H., Morin, L.P., 1974. Suppression of lordosis in guinea pigs by ethanoxytriphetol (NER-25) given at long intervals (34–46 hr) after estradiol benzoate treatment. *Horm. Behav.* 5, 63–71.
- Fernández-Guasti, A., Rodríguez-Marzo, G., Beyer, C., 1983. Effect of guanine derivatives on lordosis behavior in estrogen primed rats. *Physiol. Behav.* 31, 589–592.
- Foreman, M.M., Moss, R.L., 1977. Effects of subcutaneous injection and intrahypothalamic infusion of releasing hormones upon lordotic response to repetitive coital stimulation. *Horm. Behav.* 8, 219–234.
- García-Juárez, M., Beyer, C., Soto-Sánchez, A., Domínguez-Ordóñez, R., Gómora-Arañi, P., Lima-Hernández, F.J., Egibar, J.R., Etgen, A.M., González-Flores, O., 2011. Leptin facilitates lordosis behavior through GnRH-1 and progesterin receptors in estrogen-primed rats. *Neuropeptides* 45, 63–67.
- Gómora-Arañi, P., Beyer, C., Lima-Hernández, F.J., Gracia, M.E., Etgen, A.M., González-Flores, O., 2008. GnRH mediates estrous behavior induced by ring A reduced progesterin and vaginocervical stimulation. *Behav. Brain Res.* 187, 1–8.
- González-Flores, O., Shu, J., Camacho-Arroyo, I., Etgen, A.M., 2004. Regulation of lordosis by cyclic 3',5'-guanosine monophosphate, progesterone, and its 5 $\alpha$ -reduced metabolites involves mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 145, 5560–5567.
- González-Flores, O., Ramírez-Orduña, J.M., Lima-Hernández, F.J., García-Juárez, M., Beyer, C., 2006. Differential effect of lincase A and C blockers on lordosis facilitation by progesterone and its metabolites in ovariectomized estrogen-primed rats. *Horm. Behav.* 49, 398–404.
- González-Flores, O., Beyer, C., Lima-Hernández, F.J., Gómora-Arañi, P., Gómez-Camacho, M.A., Hofmann, K., Etgen, A.M., 2007. Facilitation of estrous behavior by vaginal cervical stimulation in female rats involves alpha-adrenergic receptor activation of the nitric oxide pathway. *Behav. Brain Res.* 176, 237–243.
- González-Flores, O., Etgen, A.M., Komisaruk, B.R., Gómora-Arañi, P., Macías-Jiménez, A., Lima-Hernández, F.J., García-Juárez, M., Beyer, C., 2008. Antagonists of the protein kinase A and mitogen-activated protein kinase systems and of the progesterin receptor block the ability of vaginocervical/flank-perineal stimulation to induce female rat sexual behaviour. *J. Neuroendocrinol.* 20, 1361–1367.
- González-Flores, O., Gómora-Arañi, P., García-Juárez, M., Gómez-Camacho, M.A., Lima-Hernández, F.J., Beyer, C., Etgen, A.M., 2009. Nitric oxide and ERK/MAPK mediation of estrous behavior induced by GnRH, PGE<sub>2</sub> and db-cAMP in rats. *Physiol. Behav.* 96, 606–612.
- González-Flores, O., Beyer, C., Gómora-Arañi, P., García-Juárez, M., Lima-Hernández, F.J., Soto-Sánchez, A., Etgen, A.M., 2010. A role for Src kinase in progesterin facilitation of estrous behavior in estradiol-primed female rats. *Horm. Behav.* 58, 223–229.
- González-Marriscal, G., Beyer, C., 1988. Blockade of LHRH-induced lordosis by alpha- and beta-adrenergic antagonists in ovariectomized, estrogen primed rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 31, 573–577.
- Gréco, E., Allagretto, E.A., Tittel, M.J., Blaustein, J.D., 2001. Coexpression of ER beta with ER alpha and progesterin receptor protein in the female rat forebrain: effects of estradiol treatment. *Endocrinology* 142, 5172–5181.
- Hagan, C.R., Favre, F.J., Lange, C.A., 2009. Scaffolding actions of membrane-associated progesterone receptors. *Steroids* 74, 568–572.
- Hall, N.R., Luttge, W.G., 1977. Dienecephalic sites responsive to progesterin E2 facilitation of sexual receptivity in estrogen-primed ovariectomized rats. *Brain Res. Bull.* 2, 203–207.
- Hartan, R.E., Shivers, B.D., Kow, L.M., Pfaff, D.W., 1983. Estrogenic maintenance of lordosis responsiveness: requirement for hypothalamic action potentials. *Brain Res.* 268, 67–78.
- Järvinen, T.A., Pello-Huikko, M., Holli, K., Isola, J., 2000. Estrogen receptor beta is coexpressed with ERalpha and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation rate in breast cancer. *Am. J. Pathol.* 156, 29–35.
- Kow, L.M., Pfaff, D., 1975. Dorsal root recording relevant for mating reflexes female rats: identification of receptive fields and effects of peripheral denervation. *J. Neurobiol.* 5, 23–37.
- Kow, L.M., Pfaff, D.W., 1998. Mapping of neural and signal transduction pathways for lordosis in the search for estrogen actions on the central nervous system. *Behav. Brain Res.* 92, 169–180.
- Lange, C.A., 2004. Making sense of cross-talk between steroid hormone receptors and intracellular signaling pathways: who will have the last word? *Mol. Endocrinol.* 18, 269–278.
- Larsson, K., Södersten, P., Beyer, C., Morañ, G., Pérez-Palacios, G., 1976. Effects of estrone, estradiol and estrinol combined with dihydrotestosterone on mounting and lordosis behavior in castrated male rats. *Horm. Behav.* 7, 379–390.
- Lima-Hernández, F.J., Beyer, C., Gómora-Arañi, P., García-Juárez, M., Encarnación-Sánchez, J.L., Etgen, A.M., González-Flores, O., 2012. Src kinase signaling mediates estrous behavior induced by 5 $\beta$ -reduced progesterin, GnRH, prostaglandin E2 and vaginocervical stimulation in estrogen-primed rats. *Horm. Behav.* 62, 579–584.
- MacLusky, M.J., McEwen, B.S., 1978. Oestrogen modulates progesterone receptor concentrations in some rat brain regions but not in others. *Nature* 274, 276–278.
- Mani, S., Portillo, W., 2010. Activation of progesterin receptors in female reproductive behavior: interactions with neurotransmitters. *Front. Neuroendocrinol.* 31, 157–171.
- Mani, S.K., Allen, J.M.C., Lyon, J.P., Mujac-Jericevic, B., Blaustein, J.D., DelMayo, F.J., Conneely, O.M., O'Malley, B.W., 1996. Dopamine requires the unoccupied progesterone receptor to induce sexual behavior in mice. *Mol. Endocrinol.* 10, 1728–1737.
- Mani, S.K., Blaustein, J.D., O'Malley, B.W., 1997. Progesterone receptor function from a behavioral perspective. *Horm. Behav.* 31, 244–255.
- Masters, D.B., Jordan, E., Beyer, C., Komisaruk, B.R., 1993. Release of amino acids into regional superfusates of the spinal cord by mechano-stimulation of the reproductive tract. *Brain Res.* 621, 279–290.
- McKenna, S.E., Simon, N.G., Collier-Clifford, A., 1992. An assessment of agonist/antagonist effects of tamoxifen in the female mouse brain. *Horm. Behav.* 26, 536–544.
- Mickevich, P.E., Dewing, P., 2011. Membrane-initiated estradiol signaling regulating sexual receptivity. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 2, 26–34.
- Mickevich, P., Sinalch, K., 2013. Temporal and concentration dependent estradiol effects on neural pathways mediating sexual receptivity. *J. Neuroendocrinol.* 25, 1012–1023.
- Migliaccio, A., Piccolo, D., Castoria, G., Di Domenico, M., Ebancio, A., Lombardi, M., Gong, W., Beato, M., Auricchio, F., 1998. Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J.* 17, 2008–2018.
- Migliaccio, A., Castoria, G., Auricchio, F., 2007. Src-dependent signaling pathway regulation by sex-steroid hormones: therapeutic implications. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 1343–1348.
- Mogulowsky, M., Raymond, J.R., 1978. Estrogen-sensitive progesterin-binding sites in the female rat brain and pituitary. *Brain Res.* 164, 165–175.
- Morañ, G., Beyer, C., 1979. Neuroendocrine control of mammalian estrous behavior. In: Beyer, C. (Ed.), *Endocrine Control of Sexual Behavior*. Raven Press, New York, pp. 33–75.
- Paxinos, G., Watson, C., 2006. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th ed. Academic Press, Australia.
- Powers, J.B., 1970. Hormonal control of sexual receptivity during the estrous cycle of the rat. *Physiol. Behav.* 5, 831–835.
- Ramírez-Orduña, J.M., Lima-Hernández, F.J., García-Juárez, M., González-Flores, O., Beyer, C., 2007. Lordosis facilitation by LHRH, PGE<sub>2</sub> or db-cAMP requires activation of the lincase A pathway in estrogen primed rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 86, 169–175.
- Ribord, P., Moss, R.L., 1983. Effects of lesions of putative LHRH-containing pathways and midbrain nuclei on lordotic behavior and luteinizing hormone release in ovariectomized rats. *Brain Res. Bull.* 11, 493–500.
- Robertson, J.A., Farrell, Y., Lindahl, L.S., Ing, N.H., 2002. Estradiol up-regulates estrogen receptor messenger ribonucleic acid in endometrial carcinoma (Ishikawa) cells by stabilizing the message. *J. Mol. Endocrinol.* 29, 125–135.
- Rodríguez-Sierra, J.F., Komisaruk, B.R., 1977. Effects of prostaglandin E2 and indomethacin on sexual behavior in the female rat. *Horm. Behav.* 9, 281–289.
- Sakuma, Y., Pfaff, D.W., 1980. LH-RH in the mesencephalic central grey can potentiate lordosis reflex of female rats. *Nature* 283, 566–567.
- Schwartz, S.M., Blaustein, J.D., Wade, G., 1979. Inhibition of estrous behavior by progesterone in rats: role of neural estrogen and progesterin receptors. *Endocrinology* 1078–1082.
- Shah, R.H., Fanchori, M.P., Janbusana, A., Cam, K.J., 2003. Roles of Src and epidermal growth factor receptor transactivation in transient and sustained ERK1/2 responses to gonadotropin-releasing hormone receptor activation. *J. Biol. Chem.* 278, 19118–19126.
- Siegel, S., Castellan, N.J., 1995. *Estadística no paramétrica: aplicada a las ciencias de la conducta*, 4a ed. Trilce, México.
- Talbot, Y., 1984. Influence of continuous illumination on estrous cycle of rats: time course of changes in levels of gonadotropins and ovarian steroids until occurrence of persistent estrus. *Neuroendocrinology* 39, 97–104.
- Wahlberg, A.E., Bowler, J., 1987. Steroidal pure antiestrogens. *J. Endocrinol.* 112, R7–R10.
- Whalen, R.E., Lauber, A.H., 1986. Progesterone substitutes: cGMP mediation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 10, 47–53.
- Wu, T.J., Gluckman, M.J., Roberts, J.L., Mani, S.K., 2006. Facilitation of lordosis in rats by a metabolite of luteinizing hormone releasing hormone. *Endocrinology* 147, 2544–2549.
- Zemlin, E.P., Adler, M.T., 1977. Hormonal control of female sexual behavior in the rat. *Horm. Behav.* 9, 345–357.