



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

La leptina induce conducta de lordosis a través del receptor GnRH-1 y el receptor a progesterona en las ratas pretratadas con estrógeno

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

M.V.Z. Raymundo Domínguez Ordóñez

Comité Tutorial

Director de Tesis

Dr. Oscar González Flores

Tutores

Dra. Margarita Martínez Gómez

Dr. José Ramón Eguibar Cuenca

Tlaxcala, Tlax.

Diciembre, 2011



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

La leptina induce conducta de lordosis a través del receptor GnRH-1 y el receptor a progesterona en las ratas pretratadas con estrógeno

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

M.V.Z. Raymundo Domínguez Ordóñez

Comité Tutorial

Director de Tesis

Dr. Oscar González Flores

Tutores

Dra. Margarita Martínez Gómez

Dr. José Ramón Eguibar Cuenca



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta



COORDINACIÓN DE LA MAESTRÍA
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 **Raymundo Domínguez Ordoñez** realiza para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“La leptina induce conducta de lordosis a través de receptor GNRHI y el receptor a progesterona en las ratas tratadas con estrógeno”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., SEPTIEMBRE 5 DE 2011


DR. JOSÉ RAMÓN EQUIBAR CUENCA


DR. OSCAR GONZALEZ FLORES


DRA. MARGARITA MARTÍNEZ GÓMEZ


DR. KURT LEROY HOFFMAN TIBER


DRA. ROSA ANGÉLICA LUCIO LUCIO


DR. FRANCISCO CASTELAN



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



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado del CTBC, UAT, por permitirme y brindarme el apoyo para mi formación como Maestro en Ciencias Biológicas.

Al CONACYT, por haberme otorgado la beca con número (CVU/Becario): 328798/230658, a partir de la fecha 01 de septiembre del 2009 hasta el 31 de agosto del 2011, con la finalidad de cursar la Maestría en Ciencias Biológicas.

Al Dr. Oscar González Flores, quien más allá de ser un excelente y admirable Doctor, ha sido un gran amigo. Además, por su confianza e inagotable paciencia para enseñarme el maravilloso mundo de la ciencia.

A la Dra. Margarita Martínez Gómez, por todo su apoyo e interés en la revisión de este trabajo de tesis.

Al Dr. José Ramón Eguibar Cuenca, por su gran empeño en la realización, revisión y asesoría de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

Al M. en C. Francisco Javier Lima Hernández, por sus sabios consejos durante mi formación académica y enseñarme a confiar en mi mismo.

Al M en C. Marcos García Juárez, quien me ha enseñado que la constancia es la base para triunfar en la vida.

Al Dr. Porfirio Gómora Arrati, por su inagotable paciencia para enseñar.

A La Bióloga Guadalupe Domínguez, por su gran carisma y entusiasmo para enseñar así como por su amistad.

DEDICATORIAS

A mi padre, Magdaleno Domínguez Vázquez, quien ha sido mi mejor amigo y el mejor ejemplo de que las cosas sólo se consiguen con esfuerzo y dedicación. Además por que me ha enseñado que el trabajo constante es el mejor aliado del hombre.

A mi madre, Juana Ordóñez, quien con su amor, afecto y apoyo sincero, me ha ayudado a superar las situaciones más difíciles de mi vida.

A mi esposa, Inés Ordóñez Santacruz, con quien he aprendido a disfrutar la vida, ya que me ha brindado su amor, cariño, comprensión y apoyo en todos los proyectos de mi vida.

A mi hijo, Marco Josué, porque su nacimiento y primeros meses de vida me han llevado a reflexionar acerca de las responsabilidades, momentos de ternura y alegría de la vida.

A mis hermanos, Ivan, Roque, Alberto, Samuel, Florentino, Benjamín, Lupita y Chuy, por sus sabios consejos y tiempos de alegría que me han brindado.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
2.1. El ciclo estral de la rata	5
2.2. Conducta de estro (CE) en roedores	7
2.3. Regulación hormonal de la CE en la rata	8
2.4. Centros nerviosos relacionados con la regulación de la CE en roedores	11
2.5. Control neuroquímico de la CE en roedores	18
2.6. Hormona Liberadora de Gonadotrofinas (GnRH)	20
2.6.1. El receptor de la GnRH	20
2.6.2. Efecto de la GnRH sobre la CE	20
2.6.3. Antide, antagonista del receptor a GnRH-1	23
2.6.4. Utilización del antide como herramienta farmacológica para explorar la participación del GnRH-1 sobre la expresión de la CE	23
2.7. El receptor intracelular de la Progesterona (P ₄)	25
2.7.1. Características estructurales y farmacológicas del RP	26
2.7.2. El RP como una fosfoproteína	29
2.7.3. Correlación entre la concentración del RP y la expresión de la CE en roedores	30
2.7.4 Características estructurales y farmacológicas del RU486	32
2.7.4.1. Mecanismo de acción del antagonista RU486	33
2.7.4.2. Antiprogestinas como herramientas farmacológicas utilizadas para explorar la participación del RP sobre la expresión de la CE	34
2.8. Leptina	35
2.8.1. Regulación de la expresión de leptina	35
2.8.2. Receptores de leptina	36
2.8.3. Vía de señalización intracelular activada por leptina	37

2.8.4. Acciones fisiológicas de la leptina	39
2.8.5. Participación de la leptina sobre diferentes procesos reproductivos	40
2.8.6. Efecto de la leptina sobre la inducción de la CE en roedores	42
2.9. Mecanismos celulares involucrados en la inducción de la CE en roedores	43
2.9.1. Mecanismo genómico	43
2.9.2. Mecanismo extragenómico	44
2.9.3. Modelo de la comunicación cruzada entre los mecanismos genómicos y extragenómicos para la estimulación de la CE	46
3. JUSTIFICACIÓN	49
4. HIPÓTESIS	50
5. OBJETIVOS	50
6. METODOLOGÍA	51
6.1. Metodología general	51
6.1.1. Animales	51
6.1.2. Procedimientos quirúrgicos	51
6.1.3. Drogas	52
6.1.4. Evaluación de la CE	52
6.2. Metodología experimento 1. Evaluación de la curva dosis-respuesta de la leptina sobre la CE en ratas ovx-pretratadas con BE y alimentadas <i>ad libitum</i>	53
6.3. Metodología experimento 2. Evaluación de la participación del receptor GnRH-1 mediante la administración de su antagonista, el antide, sobre la CE inducida por leptina	55
6.4. Metodología experimento 3. Evaluación de la participación del RP sobre la CE inducida por leptina por medio de la administración de la antiprogestina RU486	56
7. RESULTADOS	57
8. DISCUSIÓN	64
9. CONCLUSIÓN	71

10. PERSPECTIVAS	72
11. REFERENCIAS	73
12. GLOSARIO DE TÉRMINOS	107
13. PUBLICACIONES	110
13.1. Artículo publicado	110
13.2. Resumen de congreso	116

RESUMEN

Se conoce que la leptina es una hormona que predominantemente juega un papel muy importante en el balance energético del organismo ya que la falta de ésta provoca una serie de disturbios en diferentes eventos reproductivos (infertilidad, retraso en la pubertad) de mamíferos, incluyendo al ser humano. Actualmente, no se conoce si la leptina es capaz de inducir conducta de lordosis (CL) y proceptividad en el modelo de ratas desprovistas de ovarios, pretratadas con estrógenos y alimentadas *ad libitum*, por tal motivo, en la presente tesis se plantearon tres experimentos con los siguientes objetivos. El primer objetivo es realizar curvas dosis respuesta para conocer las dosis de leptina capaces de inducir la CL y proceptividad a ratas hembras en las condiciones experimentales antes descritas. Así, las dosis de leptina que se inyectaron directamente en el ventrículo lateral derecho fueron de 0.33, 1, 3 y 9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. La evaluación del cociente de lordosis, mostró que las dosis de leptina de 1 y la de 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ fueron las más efectivas en inducir la CL desde los 60 minutos, siendo el nivel máximo encontrado a los 120 minutos después de la inyección intracerebroventricular de leptina. Sin embargo, la intensidad de lordosis inducida por leptina fue muy baja, mientras que el rechazo fue alto y prácticamente este péptido no indujo proceptividad en las hembras probadas. Nuestro segundo objetivo fue el de evaluar si la CL inducida por leptina involucra la activación del receptor tipo 1 de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH-1 de sus siglas en inglés), ya que se conoce que la leptina tiene la capacidad de liberar hormona liberadora de gonadotrofinas (HLGT o GnRH de sus siglas en inglés) desde el hipotálamo. Para tal propósito, se administró por vía intracerebroventricular al Acetil-d-Ala (2-naphtil)-d-Lys (N-nicotinoil)-d-Lis (N-nicotinoil)-Leu-Lis (N-isopropil)-Pro-d-Ala-NH₂ (antide), un antagonista del GnRH-1 y se evaluó su efecto contra la CL inducida por 1 y 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de leptina que fueron las dosis más efectivas para inducir lordosis. Los resultados muestran que la CL inducida por la dosis de 1 μg de leptina fue significativamente inhibida tanto a los 60 como a los 120 minutos después de la administración previa del antide, en cambio, la CL inducida por 3 μg de leptina fue inhibida a los 60, 120 y 240 minutos, después de la administración previa del antide. Finalmente, en el tercer experimento exploramos la participación del RP sobre la CL inducida por leptina, mediante la aplicación del 17 β -hidroxi-11 β -(4-dimetil-

aminofenil)-17 α -(prop-1-inil) (RU486), un antagonista del receptor a progesterona. Los resultados muestran que la administración del RU486 disminuyó significativamente el cociente de lordosis inducido por 1 y 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de leptina a los 60 y 120 minutos. Con estos resultados podemos concluir que la leptina pudiera estar estimulando la CL a través de la liberación de GnRH y la subsecuente activación del GnRH-1, ya que el antide inhibió dicho comportamiento. Además, el hecho de que la antiprogestina RU486 haya bloqueado la lordosis inducida por leptina apoya la participación del receptor a progesterona. Sin embargo, debido a que la leptina no estimuló la proceptividad e indujo una baja intensidad de la lordosis y que existe alto rechazo, contrasta con los resultados anteriores obtenidos tanto con la progesterona o con otros agentes no esteroideos capaces de estimular una completa conducta de estro, lo cual apoya la participación de mecanismos alternativos por los cuales la leptina pudiera estimular la CL y de rechazo, pero a su vez mecanismos que estuvieran bloqueando la expresión de las conductas proceptivas.

En conclusión, la leptina puede tener efectos membranales a través de los cuales estimula las neuronas hipotalámicas que contienen GnRH.

1. INTRODUCCIÓN

La conducta de estro en roedores (CE) se manifiesta en la fase del ciclo estral donde la hembra despliega su conducta sexual para establecer contacto con un macho sexualmente activo y copular con él (Beach 1976). Esta conducta se presenta al final del proestro y se acompaña de una serie de aspectos definidos como atractividad, proceptividad y receptividad, los cuales son necesarios para que el macho detecte el estado reproductivo de la hembra. El aspecto de atractividad comprende cambios morfológicos y fisiológicos como la coloración del área genital y la producción de feromonas (Beach 1976). Por otro lado, la proceptividad se refiere a una serie de conductas estereotipadas que la hembra realiza y que son dirigidas hacia el macho para motivarlo a copular con ella. Dentro de estas conductas se encuentran; a) el brincoteo, la hembra realiza pequeños saltos con sus cuatro patas; b) carreras cortas, la hembra corre en forma de zig-zag terminando abruptamente de forma agazapada para permitir ser montada por el macho y c) orejeo, consiste en un movimiento de las orejas, debido al movimiento de alta frecuencia de la cabeza de la hembra cuando es montada por el macho (Beach 1976).

Por otro lado, la receptividad es la conducta más representativa del estro la cual consiste en que la hembra adopte la postura de lordosis. Esta conducta se caracteriza por la dorsiflexión de la región lumbar de la columna vertebral acompañada por un movimiento lateral de la cola (Komisaruk y Diakow 1973), lo que permitirá la intromisión del pene en la vagina (Hardy y DeBold 1972b, Beach 1976, Morali y Beyer 1979).

La expresión de esas conductas tiene un componente hormonal ya que requiere de la acción secuencial de dos hormonas esteroides como son; los estrógenos y la progesterona, las cuales son secretadas por los ovarios y las glándulas suprarrenales (Beach 1942). Ambas hormonas modulan la actividad de diversas estructuras cerebrales como el área preóptica (APOm), el núcleo ventromedial del hipotálamo (HVM de sus siglas en inglés), la amígdala y el hipocampo (Edwards y cols. 1968, Beyer 1980). Por ejemplo, se ha propuesto que los estrógenos preparan a esos sustratos nerviosos induciendo la síntesis de una variedad de moléculas, entre ellas, a los receptores a progesterona (RPs), para que posteriormente la progesterona (P_4) ocupe dichos receptores y sea la encargada de producir la expresión de la CE (Blaustein y Feder 1980).

Los mecanismos celulares por los cuales las hormonas sexuales como el estradiol (E_2) y la P_4 inducen la expresión de la CE en roedores se han estudiado. Sin embargo, debido a la gran variedad de neuromoduladores o mediadores de los efectos celulares, con diferentes estructuras químicas capaces de inducir CE en roedores, como la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH de sus siglas en inglés), la prostaglandina E_2 (PGE_2), la oxitocina, la noradrenalina etc., se ha propuesto que dos mecanismos celulares podrían estar participando en la regulación de la CE: a) el clásico mecanismo genómico (Jensen y cols. 1968) en donde se requeriría de la síntesis de proteínas para que se produzca la CE. Este mecanismo se activaría con una latencia de varias horas después de haberse administrado la progesterona (Edwards y cols. 2003) ya que requeriría que la hormona (progestinas naturales o sintéticas) se uniera a su receptor intracelular, el receptor a progesterona (RP) y así activar a la maquinaria transcripcional involucrada en la expresión de la CE, a nivel del ácido desoxirribonucleico (ADN). La participación del RP en este fenómeno ha sido posible gracias a la utilización de la antiprogestina 17β -hidroxi- 11β -(4-dimetil-aminofenil)- 17α -(prop-1-inil) (RU 486), la cual muestra mayor afinidad por el RP que la P_4 evitando sus efectos progestacionales como la inducción de la CE en la rata (Brown y Blaustein 1984, Beyer y cols. 1995) y b) el membranal o extragenómico (Beyer 1980, Beyer y Canchola 1981), que es producido por una variedad de compuestos como la GnRH, la PGE_2 , la oxitocina, la noradrenalina, etc., que debido a su naturaleza lipofóbica, no penetran en la célula sino que sus efectos los generan al actuar con sus receptores localizados en la membrana celular provocando la síntesis de nucleótidos cíclicos que actúan como segundos mensajeros, como el adenosín monofosfato cíclico (AMPC) o el guanósín monofosfato cíclico (GMPc). Por su parte, estos compuestos al unirse a su correspondiente proteína cinasa (proteína cinasa A; PKA, proteína cinasa G; PKG), llevan a cabo la fosforilación de proteínas que pudieran estar relacionadas con el despliegue de la lordosis, como por ejemplo al RP (González-Flores y cols. 2004, Acosta-Martínez y cols. 2006, González-Flores y cols. 2006, Ramírez-Orduña y cols. 2007). La participación de este mecanismo, sobre la regulación de la CE, ha sido apoyada gracias a las observaciones en donde la inducción de la CE se presenta con un intervalo de tiempo muy corto de 15 minutos después de la administración de alguno de los agentes inductores de lordosis. Sin embargo, actualmente se ha propuesto que tanto el mecanismo genómico como el membranal pueden

tener una comunicación cruzada, en donde el RP actuaría como el mediador molecular común involucrado en la regulación de la inducción de la CE (Mani y Portillo 2010).

Actualmente se ha descrito que compuestos producidos principalmente en las células adiposas, como la leptina, también podrían estar relacionados con diversos procesos reproductivos. Esta hormona es un péptido compuesto por 167 aminoácidos que regula la ingesta de alimentos, el gasto energético, el peso corporal (Campfield y cols. 1995, Ahima y Flier 2000) y funciones reproductivas involucradas principalmente con el inicio de la pubertad y la secreción de la GnRH en una variedad de hembras de roedores (Mantzoros 2000). Por otro lado, los efectos de la leptina se producen a través de su unión con sus receptores membranales localizados en diferentes núcleos hipotálamicos, siendo más abundante su distribución en el núcleo arqueado (Narc), el hipotálamo dorsomedial (DMH de sus siglas en inglés), el hipotálamo ventromedial (HVM) y el núcleo premamilar ventral; una moderada expresión de estos receptores se encuentra en el núcleo periventricular (PMV de sus siglas en inglés), así como en el área hipotalámica lateral; aún menores niveles existen en el núcleo paraventricular (PVN de sus siglas en inglés; Mercer y cols. 1996, Chen y cols. 1997, Elmquist y cols. 1997, Elmquist y cols. 1998). Actualmente hay controversia en cuanto si las neuronas GnRHérgicas contienen receptores a leptina (Magni y cols. 1999), sin embargo, lo que es claro es que la administración tanto sistémica como intracerebral de leptina induce la liberación de la GnRH (Yu 1997). Por otro lado, existe abundante literatura que señala que la liberación de este péptido por leptina, puede ser producida de manera indirecta, ya que la leptina se puede unir a la isoforma larga de su receptor (Ob-Rb), la cual se encuentra en la membrana de neuronas kisspeptinérgicas. Estas neuronas secretan a la kisspeptina, hormona que actúa directamente sobre su receptor, el receptor a proteína G54 (GPR54), localizado en neuronas GnRHérgicas y así provocar su liberación (Aparicio 2005).

La mayoría de los datos que actualmente se han generado sobre la participación de la leptina en la inducción de la CL, han utilizado modelos con hembras obesas que carecen del gen productor de la leptina o del gen productor de su receptor (Ob-R; Wade y cols. 1997, Schneider y cols. 2008, Fox y Olster 2000). Por lo tanto, un modelo animal que podría ser atractivo para estudiar los efectos de la leptina sobre la expresión de la CE, es el utilizado en esta tesis como lo es la rata ovariectomizada (ovx) pretratada con estradiol (E₂) y alimentada

ad libitum. En estas condiciones experimentales se podrá explorar el mecanismo celular por el cual la leptina estaría regulando la CE y así poder establecer los mecanismos intracelulares involucrados durante la expresión de dicha conducta.

2. ANTECEDENTES

2.1. El ciclo estral de la rata

El ciclo estral se define como el período comprendido entre la aparición del estro (receptividad sexual) y el comienzo del siguiente, o bien, el intervalo de tiempo comprendido entre dos ovulaciones. Durante el ciclo estral de la rata se presentan cuatro etapas (proestro, estro metaestro y diestro), caracterizadas por cambios a nivel endocrinológico, histológico y conductual, a pesar de ser un ciclo de corta duración (4 ó 5 días), debido a que el cuerpo lúteo en esta especie dura muy poco tiempo (Freeman 1994).

Proestro

Este periodo tiene una duración de 12 a 14 horas y es la fase del ciclo estral en donde la GnRH se libera desde el hipotálamo hasta la hipófisis, provocando la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH de sus siglas en inglés). Esta hormona, a su vez, al llegar a los ovarios induce el crecimiento de folículos para que secreten grandes cantidades de estrógenos, principalmente 17β -estradiol (Figura 1). Esta hormona al actuar directamente en el hipotálamo, inducirá la concentración de la GnRH en la hipófisis anterior para que se produzca la liberación de la hormona luteinizante (LH de sus siglas en inglés), la cual al llegar al ovario provocará la ovulación así como la formación de un cuerpo lúteo para que se secrete P_4 (Eto y cols. 1962, Hashimoto y cols. 1968).

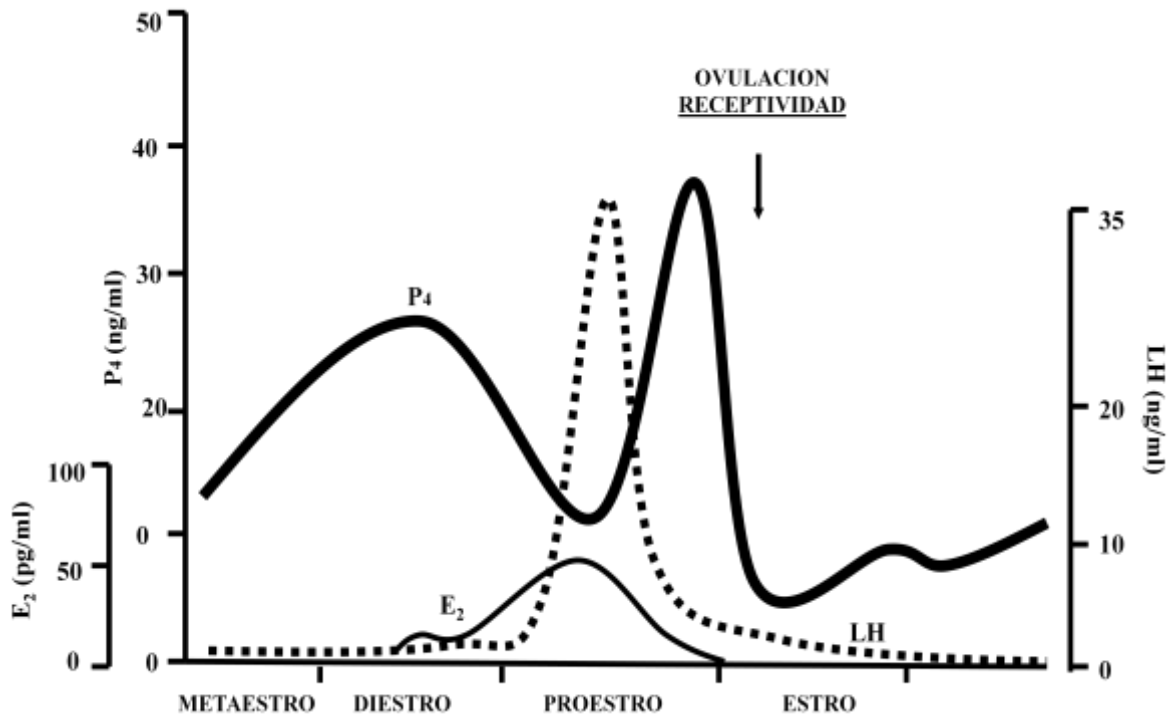
Estro

Durante esta etapa la hembra muestra un máximo nivel de receptividad sexual (Long y Evans 1922, Mandl 1951), con una duración de 13 a 15 horas. Además, los niveles plasmáticos de P_4 se incrementan (Freeman 1994) provocando el bloqueo de la liberación hipotalámica de GnRH y la inhibición de la secreción hipofisiaria de la FSH y la LH, por lo que se evita el crecimiento folicular y la ovulación.

Metaestro

Este es un periodo en el cual la receptividad sexual en la hembra no se presenta. Al final de

A)



B)

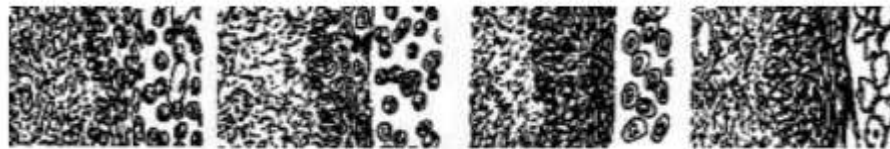


Figura 1. Patrón de secreción hormonal durante el ciclo ovárico de la ratona. Se puede observar el periodo en el cual ocurre la receptividad sexual y la ovulación en relación a las concentraciones hormonales. (Tomado de Baulieu y Robel, 1990). B) Citología vaginal observada a través de frotis vaginales. Los cambios en la citología vaginal corresponden a los cambios hormonales de la hembra. Durante el proestro se pueden observar células epiteliales basales con núcleo bien definido. En el estro se observan células epiteliales cornificadas con citoplasma granular. Durante el metaestro se puede ver leucocitos, células cornificadas y bacterias. Finalmente en el diestro predomina una gran cantidad de leucocitos. (Modificado de Nelson, 1995). E_2 = estradiol; P_4 = progesterona; LH= hormona luteinizante.

este periodo se observa un segundo pico en las concentraciones de P_4 provenientes del cuerpo lúteo recién formado (Eto y cols. 1962, Hashimoto y cols. 1968). Sin embargo, no es suficiente para mantener su actividad, por lo que esta fase es relativamente breve ya que muestra una duración de 6 a 8 horas.

Diestro

Durante este periodo, las hormonas producidas por los ovarios se encuentran elevadas, por lo que se produce un periodo de reposo con una duración de entre 55 y 57 horas. La actividad hipofisiaria es baja debido a la acción inhibitoria producida por la P₄. Si al final del diestro no se ha producido la implantación embrionaria, las concentraciones de P₄ generadas por el cuerpo lúteo disminuyen, lo que provoca que la hipófisis anterior ya no se encuentre inhibida y por lo tanto se reinicie la liberación de FSH y se comience un nuevo ciclo estral en los ovuladores espontáneos (Long y Evans 1922, Mandl 1951).

2.2. Conducta de estro (CE) en roedores

La CE se presenta en el periodo en el cual la hembra despliega su conducta sexual con el propósito de establecer suficiente contacto con un macho sexualmente experto y copular con él (Beach 1976, Erskine 1989). La expresión de la CE depende de la secreción secuencial de estrógenos y la P₄ desde el ovario, lo que provoca que la hembra despliegue una variedad de patrones motores que sean detectados por el macho para que lleve a cabo el apareamiento sexual. Además, durante este periodo, también ocurre la ovulación debido a la acción de la LH sobre el ovario (Freeman 1994).

Los patrones motores característicos de la CE se presentan al final del proestro y han sido definidos como: atractividad, proceptividad y receptividad, comportamientos necesarios para que la hembra en estro sea detectada por el macho.

La atractividad comprende cambios a nivel morfológico y fisiológico; como; cambios en la coloración del área genital y la producción de feromonas (Beach 1976). Las hembras de roedores proceptivas, despliegan tres tipos de conductas a) el brincoteo (*o hopping en inglés*), el cual consiste en pequeños brincos efectuados por la hembra sobre sus cuatro patas; b) carreras cortas (*o darting en inglés*), que consiste en carreras en forma de zig-zag que terminan abruptamente cuando la hembra adopta una postura agazapada para permitir ser montada por el macho y c) orejeo (*o ear-wiggling en inglés*), el cual consiste en un movimiento de las orejas, debido al movimiento de alta frecuencia de la cabeza de la hembra a consecuencia de la monta del macho (Beach 1976). Finalmente, en la rata como en un gran número de mamíferos, el patrón conductual más representativo de la receptividad sexual es la adopción de la postura

de lordosis cuando el macho monta a la hembra (Figura 2). Este reflejo consiste en la dorsiflexión de la columna lumbar que se acompaña de la elevación de la región perigenital y seguida por un movimiento lateral de la cola (Komisaruk y Diakow 1973), que permitirá la intromisión del pene dentro de la vagina (Hardy y DeBold 1972b, Beach 1976, Morali y Beyer 1979, Pfaff y Sakuma 1980).

La receptividad sexual de la rata hembra se evalúa a través del cociente de lordosis (Hardy y DeBold 1972, Beach 1976), que resulta al dividir el número de lordosis producidas por la hembra entre diez montas realizadas por el macho y el resultado multiplicarlo por cien. Además, Hardy y DeBold (1972), con el propósito de evaluar la intensidad de lordosis, propusieron una escala de 0 a 3, dependiendo del grado de dorsiflexión de la columna vertebral que manifieste la hembra durante la monta del macho (Figura 2). Además, durante este periodo las hembras también pueden manifestar algunas conductas de rechazo. El rechazo se define como la resistencia que la hembra opone al intentar ser montada por un macho. La conducta de rechazo se considera hormona-dependiente y tiene una correlación negativa con la conducta de lordosis (CL), siendo máxima durante el diestro y mínima durante el estro (Beach 1976). Este ha sido denominado resistencia activa por Kuehn y Beach (1963), postura erguida de defensa por Grant y Mackintosh (1963) y combate por Dewsbury (1967). Esta resistencia puede manifestarse ya sea por a) vueltas, que consisten en giros del tronco hacia el macho cuando este intenta montar a la hembra, b) huidas, que son pequeñas carreras que la hembra realiza una vez que el macho intenta montar a la hembra, c) boxeo, que consta de movimientos rápidos de las patas anteriores de la rata en contra de un macho, d) chillido, que son vocalizaciones realizadas por el animal y e) patadas realizadas con las patas traseras de la rata hembra.

2.3. Regulación hormonal de la CE en la rata

Las hormonas sexuales, principalmente el E_2 y la P_4 activan diversas estructuras cerebrales involucradas en el despliegue de la CE en roedores (Beach 1942, Edwards y cols. 1968, Beyer 1980). Por ejemplo, en la rata se origina un incremento gradual en la secreción de E_2 por los ovarios durante las primeras horas del ciclo estral, alcanzando su nivel máximo en la tarde del proestro (Figura 1). Unas horas después del pico de E_2 , el ovario comienza a secretar, por las

células de la teca interna, a la P_4 , que alcanza su nivel más alto en la noche del proestro (Edwards y cols. 1968, Ichikawa y cols. 1974, Clemens y Weaver 1985), coincidiendo con el inicio de la receptividad sexual.

Se ha propuesto que los estrógenos actúan inicialmente sensibilizando al sustrato nervioso (APOm, HVM, sustancia gris central mesencefálica, habénula etc.) relacionado con la activación de la CE, mientras que la P_4 es quien dispara su expresión (Edwards y cols. 1968, Yanase y Gorski 1976, Beyer 1980).

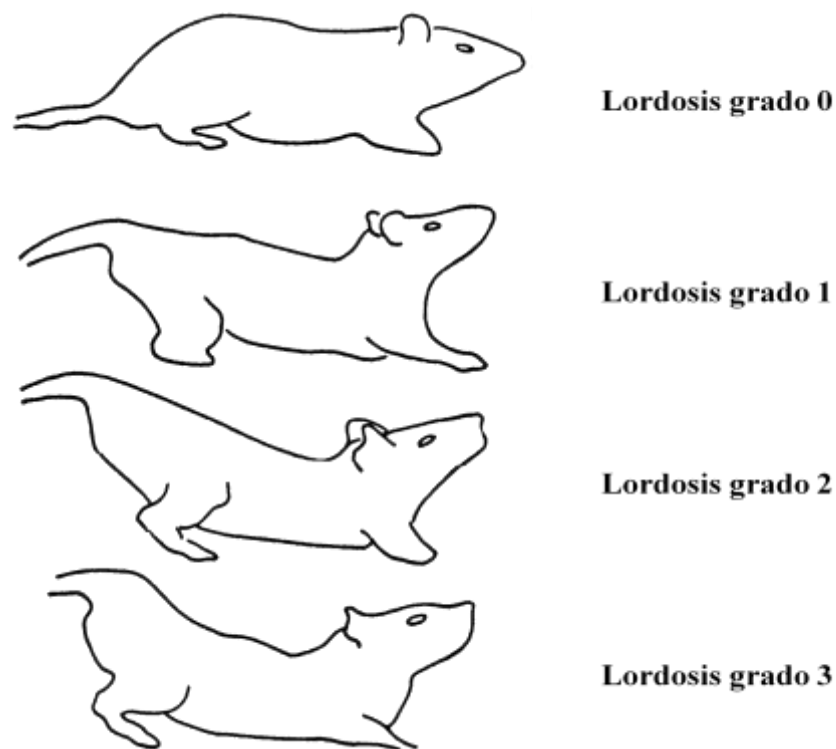


Figura 2. *Intensidad de la lordosis en la rata. La Figura muestra la intensidad de la lordosis cuando la hembra en estro es montada por un macho. Modificada de Pfaff y cols. (1994).*

Esta idea es apoyada por el hecho de que al realizar la ovariectomía (ovx), en la tarde del proestro, es decir, antes del pico preovulatorio de P_4 , la hembra no desplegará la CE a pesar de haber estado expuesta a niveles máximos de E_2 (Powers 1970). Por otro lado, si la ovx se realiza después de que ocurrió el pico de P_4 (Moreines y Powers 1977), la rata mostrará el repertorio normal de la CE, como es la lordosis y proceptividad (Powers 1970, Clemens y

Weaver 1985). Por otro lado, la CE en ratas ovx, puede ser inducida a través de la inyección de dosis repetidas de diferentes estrógenos, por ejemplo, estudios sistemáticos realizados por Beyer y colaboradores en la década de los 70s (Beyer y cols. 1971, Morali y Beyer 1979), demostraron que el E₂ es el estrógeno más potente para inducir CE en la rata ovx, seguido de la estrona y el estriol. Otros estudios han revelado que la dosis de E₂ se encuentra relacionada con la expresión de los componentes de la CE, como la intensidad de la dorsiflexión de la lordosis y la frecuencia con que la hembra presenta las diferentes conductas proceptivas, aunque estas conductas han sido mayormente atribuidas a los efectos de la P₄ (Hardy y DeBold 1972a, b). Además, en ratas ovx tratadas con dosis crecientes de E₂, la latencia para responder con lordosis a la monta del macho se acorta, mientras que la duración de la lordosis se prolonga y la intensidad de la lordosis aumenta (Zemlan y Adler 1977).

Si bien, la CE es estimulada por la sola administración de estrógenos a ratas (Beyer y cols. 1971) y cuyos ovx (Pfaff y Sakuma 1980), como se mencionó en secciones anteriores, la administración de P₄ incrementa el nivel de receptividad en comparación con el obtenido por la sola administración de estrógenos (Beach 1942, Zucker y Goy 1967, Edwards y cols. 1968). No obstante, para que la P₄ induzca la CE es de crucial importancia que las hembras hayan sido expuestas a estrógenos por un periodo mínimo de tiempo, entre 12 y 18 horas para la síntesis de proteínas (Dempsey y cols. 1936, Boling y Blandau 1939).

Por otro lado, la latencia para que las ratas ovx pretratadas con E₂ inicien la CE después de la administración de la P₄, depende de la vía y la forma de administración utilizada. Por ejemplo, si la P₄ se administra por vía subcutánea (sc), la receptividad aparecerá entre 2 y 6 horas después (Glaser y cols. 1983), mientras que la inyección por vía intravenosa (iv) de esta hormona (Lisk 1960, Kubli-Garfias y Whalen 1977) produce que la latencia de la lordosis sea menor y comience a observarse alrededor de los 30 minutos post-inyección. Además, cuando la P₄ es administrada directamente al sustrato nervioso relacionado con la lordosis en forma de cristales (Ross y cols. 1971, Rubin y Barfield 1983b, Glaser y cols. 1985), se acorta significativamente la latencia de aparición de esta respuesta, en relación al efecto que se produce cuando la P₄ es administrada por vía sc, ya que se han reportado latencias más largas en la expresión de la lordosis que van de entre una y cuatro horas (Powers 1972, Rubin y Barfield 1983). Además, Beyer y cols. (1988), encontraron que la administración de diferentes

progestinas (P_4 , o algunos de sus metabolitos como la 5α -pregnandiona, la 20α - y 20β -OH-pregnanona, la $5\beta,3\beta$; $5\alpha,3\beta$ y la $5\alpha,3\alpha$ -pregnanolona) en microdepósitos oleosos directamente en el HVM o el APOM, facilitan la lordosis con latencias muy cortas, ya que en esta forma los compuestos pueden difundirse más fácilmente que los administrados en cristales, aún utilizando el mismo sustrato nervioso (Beyer y cols. 1988). Por ejemplo, se ha reportado que el metabolito de la P_4 , la $5\beta, 3\beta$ pregnanolona, es muy efectivo para inducir la CL tanto implantado en forma de cristales en el APOM (Rodríguez-Manzo y cols. 1986) como administrado en microdepósitos oleosos. Además, la administración en soluciones oleosas directamente en el APOM y en el HVM de progestinas 5α reducidas ($5\alpha, 3\alpha$ pregnandiona y $5\beta, 3\beta$ pregnanolona), también producen intensa CL en ratas ovx pretratadas con E_2 (Beyer y cols. 1988). Sin embargo, se ha reportado que algunas progestinas administradas en cristales en el APOM son muy poco efectivas en inducir la CL (Ross y cols. 1971, Rubin y Barfield 1983b, Rodríguez-Manzo y cols. 1986). Este efecto se puede deber a problemas de difusión ya que las progestinas disueltas en aceite pueden difundirse más rápidamente y tener una mayor área de absorción que las que se encuentran en forma de cristales (Hirano y cols. 1982). Estos factores pueden explicar la falta de respuesta que se tiene con la aplicación de cristales en el APOM en donde sus neuronas relacionadas con la expresión de la lordosis tienen una distribución muy separada (Warembourg 1985, Morrell y cols. 1986). Una estrategia ampliamente utilizada en nuestro laboratorio y que consideramos que nos permite asegurar que el compuesto utilizado llegará a las áreas cerebrales relacionadas con la expresión de la CE, es realizar implantes en el ventrículo lateral derecho (vld) ya que con ello el líquido cefalorraquídeo llevará los compuestos a esas áreas cerebrales. Además, esta técnica también nos permite realizar curvas dosis respuesta para conocer cuáles son las dosis más adecuadas de la droga en cuestión para inducir la CE.

2.4. Centros nerviosos relacionados con la regulación de la CE en roedores

El sistema nervioso se divide en sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP). El sistema nervioso se desarrolla a partir del ectodermo dorsal que posteriormente formará a la placa neural, que al invaginarse y cerrarse origina al tubo neural. La porción rostral del tubo neural origina al encéfalo; la posterior, a la médula espinal. Se describen tres vesículas encefálicas

llamadas: a) prosencéfalo (cerebro anterior); b) mesencéfalo (cerebro medio) y c) rombencéfalo (cerebro posterior; Carlson 1998).

Posteriormente, estas vesículas se diferencian para dar origen a diferentes estructuras del sistema nervioso, por ejemplo, del prosencéfalo se deriva la corteza cerebral, los ganglios basales, el sistema límbico, el tálamo y el hipotálamo. Del mesencéfalo surge el *tectum* y el *tegmentum*. Finalmente, del rombencéfalo se originan el cerebelo, el puente de Varolio y el bulbo raquídeo (médula oblonga; Carlson 1998).

Ahora bien, por medio de la estimulación eléctrica, lesiones cerebrales e implantes hormonales se han identificado diferentes áreas cerebrales relacionadas con la facilitación y la inhibición de la CE en diferentes especies de roedores (ver Tablas 1 y 2). Por otro lado, en la Figura 3 se muestra un esquema simplificado de las áreas cerebrales y conexiones nerviosas involucradas con la expresión de la CL en la rata. Este esquema divide al sistema nervioso en varios módulos que incluyen al cerebro anterior, hipotálamo, cerebro medio, el tallo cerebral y a la médula espinal.

Módulo del cerebro anterior

En esta región cerebral se localizan el área APOm, el septum, el bulbo olfatorio, etc., áreas que se conoce que ejercen efectos inhibitorios sobre la CL, ya que la lesión en el APOm de la rata hembra adulta ovx, facilita la receptividad sexual (Law y Meagher 1958, Malsbury y cols. 1981). Además, las hembras que han sido lesionadas en esta área, requieren menor cantidad de estrógenos para exhibir CL que las hembras ovx que no han sido lesionadas (Singer 1968, Powers y Valenstein 1972). Por otro lado, estímulos eléctricos producidos en esta área, provocan una inhibición del reflejo de lordosis y un aumento de las conductas de rechazo, tanto en ratas intactas u ovx previamente tratadas con E₂ y P₄ (Sakuma y Pfaff 1979a). Por otro lado, con el uso de técnicas de autorradiografía e inmunocitoquímica se ha encontrado que las neuronas del APOm poseen receptores a estrógenos y P₄ (Pfaff y Sakuma 1979b), ya que implantes de E₂ en forma de cristales, directamente en esta área, restauran el reflejo de lordosis en hembras ovx (Sakuma y Pfaff 1979b, Wilcox y cols. 1984). Además, este mismo efecto se manifiesta cuando la P₄ se administra en forma de cristales o disuelto en aceite dentro del APOm de ratas ovx pretratadas con inyecciones sc de BE (Rodríguez-Manzo y cols.

1986, Beyer y cols. 1988, Beyer y González-Mariscal 1991). El septum y el bulbo olfatorio, también han sido áreas relacionadas con la inhibición de la CE en diferentes especies de roedores. Por ejemplo, la lesión eléctrica, sobre todo en el *septum* lateral en la rata, claramente induce la expresión de la CL, mientras que en el hámster provoca el efecto contrario, aparentemente por incrementar la sensibilidad al E₂ y la P₄ (Nance y cols. 1974, Nance y cols. 1975). Por otro lado, la remoción del bulbo olfatorio en ratas ovx tratadas solo con estrógenos (Moss 1971) o con estrógenos más P₄ (McGinnis y cols. 1978), provoca un incremento en la CL (Zasorin 1975).

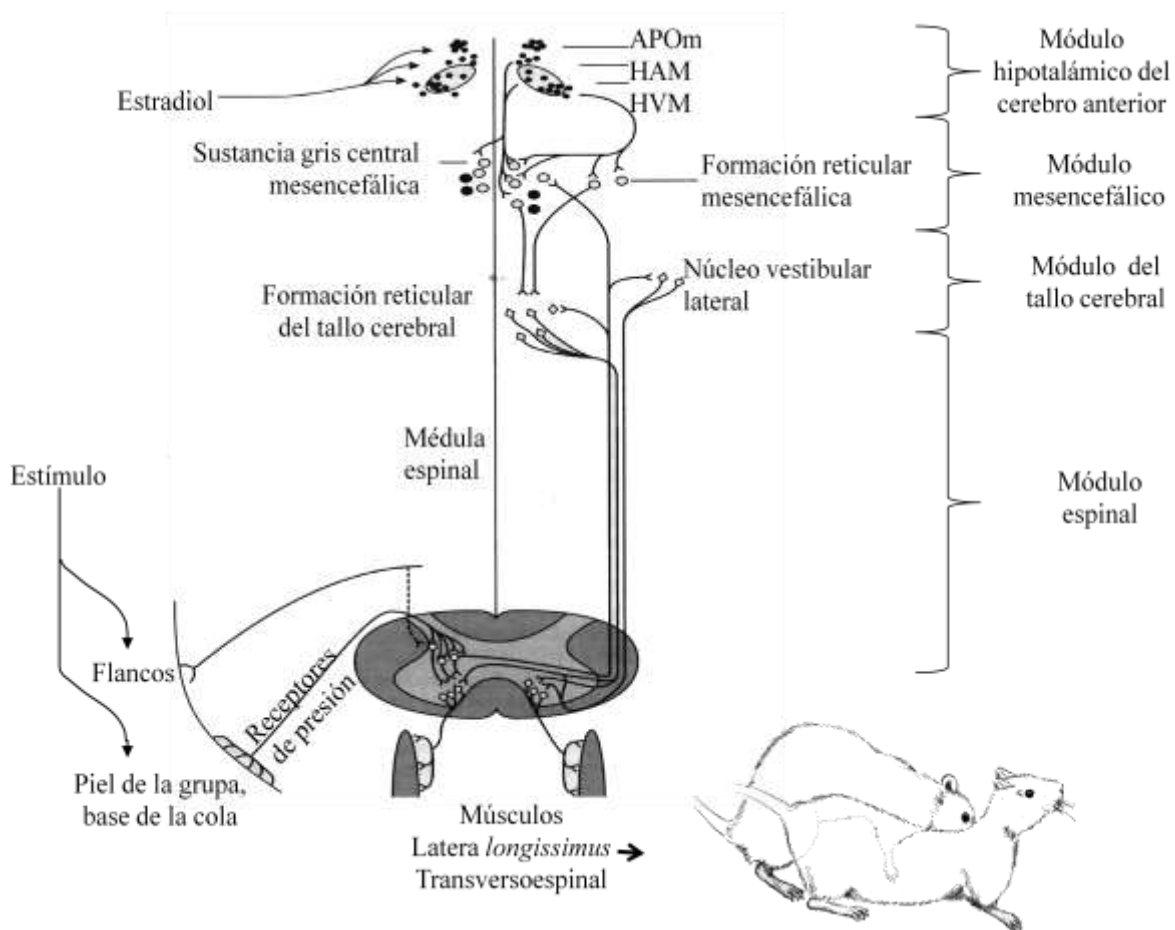


Figura 3. Circuito nervioso de la lordosis en la rata. Las neuronas hipotalámicas son estimuladas por señales sensoriales y los niveles hormonales circulantes en la sangre. Explicación en el texto. APOm = área preóptica media; HAM = hipotálamo anteromedial; HVM = hipotálamo ventromedial. Modificado de Pfaff y cols. (1994).

Tabla 1. Efecto de las técnicas de lesión y estimulación eléctrica en las diversas áreas del cerebro sobre la conducta sexual femenina.

Area	Especie	Estimulación eléctrica	Lesión	Referencias
Hipotálamo anterior	Rata	No afecta	-	(Greer 1953, Singer 1968)
	Cuyo		-	(Brookhart y cols. 1940, Dey y cols. 1940)
	Hámster		-	(Malsbury y cols. 1977)
	Gata		-	Sawyer y Robinson 1956.
	Oveja		-	(Clegg y cols. 1958)
HVM	Rata		-	(Pfaff y Sakuma 1979)
	Cuyo		-	(Goy y Phoenix 1963)
	Conejo		-	(Sawyer 1959)
	Gata		-	Sawyer y Robinson 1956
	Hámster		-	(Kow y cols. 1974)
	Oveja		-	(Clegg y Ganong 1960)
N. Amigdaloides	Gata		+	(Gastaut 1952, Schreiner y Kling 1953)
	Rata		+	(Zouhar y DeGroot 1963)
SGC	Rata	+		(Nance y cols. 1974, Sakuma y Pfaff 1979)
	Rata		-	(Nance y cols. 1974)
Estría terminal	Rata		-	(Rodgers y Law 1967, Modianos y cols. 1975)
	Rata			(Napoli y cols. 1972, Moss y cols. 1974)
APOm	Hámster			(Malsbury y Pfaff 1973)
	Rata		+	(Singer 1968, Powers y Valenstein 1972)
NSQ	Hámster		No afecta	(Malsbury y cols. 1977)

HVM: Hipotálamo ventromedial ; APOm: área preóptica media; SGC: sustancia gris central; NSQ: núcleo supraquiasmático; +: facilitación; -: inhibición.

Tabla 2. Efecto del implante de estrógenos y progesterona sobre la conducta sexual femenina en varias especies.

AREA	ESPECIE	PROGESTERONA	ESTROGENOS	REFERENCIAS
HVM	Rata		+	(Ross y cols. 1971, Davis y cols. 1979)
APOm	Rata		+	(Barfield y Chen 1977)
	Coneja		+	(Harris y Michael 1964)
SGC	Cuyo		+	(Floody y cols. 1986)
HVM	Rata		+	(Rubin y Barfield 1980)
HBM	Rata	+		(Powers 1972, Marrone y cols. 1979)
	Cuyo	+		(Morin y Feder 1974a)
FR y N. Habemular	Rata	+		(Tennent y cols. 1982)
APOm	Hamster	+		(Morin y Feder 1974a)
	Cuyo	+		(Takahashi y Lisk 1985)
SGC	Cuyo	-		(Morin y Feder 1974b)
HVM	Hamster	+		(Takahashi y Lisk 1986)
	Rata	+		(Rubin y Barfield 1983b, a)

HBM: hipotálamo medio basal; APOm: área preóptica media; SGC: sustancia gris central; HVM: hipotálamo ventromedial; FR: formación reticular; +: estimulación, -: inhibición.

Módulo hipotalámico del cerebro anterior

En este módulo cerebral, a diferencia del anterior, se localizan diversos núcleos involucrados en la facilitación de la CL. Uno de ellos, y quizá el más importante, es el núcleo hipotalámico ventromedial y lateral (Pleim y Barfield 1988), ya que lesiones bilaterales realizadas en estas regiones disminuyen la expresión de la CL tanto en ratas (Singer 1968, Malsbury y cols. 1977, Pfaff y Sakuma 1979), hámsters (Malsbury y cols. 1977) y cuyos (Brookhart y cols. 1941, Dey y cols. 1942) con ciclos estrales normales. Por el contrario, la estimulación eléctrica del HVM facilita la lordosis en ratas pretratadas con dosis bajas de BE (Pfaff y Sakuma 1979). Sin embargo, ni la estimulación eléctrica o la lesión de este núcleo cerebral muestran efectos inmediatos, ya que se requieren periodos prolongados para evaluar su efecto sobre la inducción o la inhibición de la lordosis.

Estudios inmunocitoquímicos y auto-radiográficos también han mostrado un papel preponderante del HVM en la regulación de la CE, ya que se ha mostrado que las células de este núcleo poseen receptores a E_2 y P_4 (Pfaff y Sakuma 1979). Al administrar pequeñas cantidades de P_4 directamente en el HVM se facilita la expresión de la CE en ratas ovx pretratadas con BE (Blaustein y cols. 1987).

Otras áreas relacionadas con la expresión de la CL en roedores han sido el área tegmental ventral (ATV), ya que al igual que en el HVM los implantes de P_4 o P_4 conjugada con suero de albúmina facilitan la lordosis en el hámster y la rata (DeBold y Malsbury 1989, Frye y cols. 1996), mientras que por otro lado, las lesiones del núcleo habenuar reducen las conductas proceptivas y la receptividad en ratas ovx tratadas con E_2 (Rodgers y Law 1967, Modianos y cols. 1975).

Módulo mesencéfalico

En esta región se localizan la sustancia gris central mesencefálica (SGCM) y la formación reticular mesencefálica (FRM; ver Figura 3), las cuales reciben señales provenientes de las fibras descendentes del HVM y se extienden hasta las neuronas retículo-espinales de la parte más baja del tallo cerebral (Kow y cols. 1977, 1979). La lesión de la SGCM provoca la pérdida inmediata de la CE en ratas ovx pretratadas con estrógenos, (Corodimas y Morrell 1990) y P_4 (Hennesey y cols. 1990). Sin embargo, la estimulación eléctrica de la SGCM

facilita la expresión de dicha conducta en ratas ovx pretratadas con E₂ (Sakuma y Pfaff 1979a). En contraste con el HVM, la estimulación de la SGCM provoca una clara e inmediata aparición de la CE.

Módulo del tallo cerebral

En este módulo se procesa la información relacionada a la postura de lordosis y su intensidad, es por eso, que esta estructura es indispensable para que la hembra realice con éxito el reflejo de lordosis durante la monta del macho (Modianos y Pfaff 1976). Las fibras del tallo cerebral descienden a la médula espinal a través de los tractos vestibulo-espinal y retículo-espinal (Zemlan y cols. 1979). Es por eso que la ablación completa de estos tractos provoca que la rata sea incapaz de realizar el reflejo de lordosis (Modianos y Pfaff 1976).

Módulo espinal

La médula espinal recibe la mayor parte de la información somatosensorial que la hembra recibe en la región perianal, la grupa y los flancos cuando es montada por el macho durante la cópula (Kow y cols. 1979). De tal manera que las hembras con lesiones en los cordones espinales dorsales no pueden realizar la CL (Labombarda y cols. 2000). Asimismo, el tamaño de los campos receptivos de las neuronas sensoriales de estas regiones se incrementa cuando las hembras son tratadas con estrógenos (Komisaruk y cols. 1972), ya que se ha encontrado que las neuronas sensitivas de las astas dorsales de la médula espinal poseen receptores a estrógenos. Además, diversos grupos de investigación también han reportado la presencia del RP en motoneuronas de la lamina IX de las astas ventrales (Kow y cols. 1977).

Control diferencial de la lordosis y la proceptividad

La proceptividad y la receptividad pudieran ser controladas por diferentes poblaciones neuronales. Así, en roedores, las neuronas sensibles a E₂ y P₄ activan el reflejo de lordosis a través de axones descendentes hacia la SGCM, el tallo cerebral y la médula espinal (Figura 3). En cambio, la proceptividad es un acto voluntario en respuesta a estímulos provenientes del medio ambiente (Hudson y Vodermyer 1992, Chirino y cols. 1993), que probablemente involucra la activación de neuronas de la corteza cerebral. Estas neuronas estimulan a las

motoneuronas de la médula espinal involucradas en el despliegue de las diferentes conductas proceptivas como son; hopping, darting y ear wiggling (ver Figura 4). Al parecer, las neuronas hipotalámicas que facilitan la proceptividad envían proyecciones ascendentes a las regiones rostrales del cerebro anterior. Además, las neuronas involucradas en la integración de estos patrones voluntarios estereotipados se han encontrado en la región lateral del HVM en la rata, las cuales tienen conexiones con el septum, el núcleo del lecho de la estría terminal, el área preóptica, la amígdala y la corteza prefrontal (Millhouse 1973).

2.5. Control neuroquímico de la CE en roedores

Como fue mencionado en secciones anteriores, la CE es inducida por la acción secuencial de E_2 y P_4 , sin embargo, también puede ser facilitada o inhibida por una amplia variedad de neurotransmisores o neuromoduladores. Entre los diferentes agentes que se han descrito como facilitadores de la CE se encuentran: 1) péptidos y proteínas, ej., la GnRH (Moss y McCann 1973, Moss y Foreman 1976, Beyer y cols. 1982), oxitocina (Harlan y Pfaff 1983, Caldwell y cols. 1986, Schumacher y cols. 1990), prolactina (Harlan y Pfaff 1983), sustancia P (Dornan y cols. 1989), colecistocinina (Dornan y cols. 1989), leptina (Wade y cols. 1997); 2) aminas biogénicas, ej., noradrenalina (Fernández-Guasti y cols. 1985, Etgen 1990), dopamina (Foreman y Moss 1979, Kaufman y cols. 1988, Apostolakis y cols. 1996); 3) acetilcolina (Dohanich y cols. 1984, Kaufman y cols. 1988); 4) prostaglandina E_2 (PGE_2 ; Hall y cols. 1975, Dudley y Moss 1976, Rodríguez-Sierra y Komisaruk 1978); 5) aminoácidos, como el ácido gama amino butírico (GABA; Agmo y cols. 1989, McCarthy y cols. 1991, Frye y DeBold 1992) y 6) algunos segundos mensajeros, como el AMPc y el GMPc (Beyer y cols. 1981, Fernández-Guasti y cols. 1983, Chu y Etgen 1997).

Por otro lado, existen agentes que dependiendo de los receptores con los que interactúan pueden tener acciones opuestas sobre la CE. Por ejemplo, la serotonina al actuar sobre los receptores 5HT1A inhibe la CE, mientras que al ocupar los receptores tipo 5HT2 la facilita (Wilson y Hunter 1985, Mendelson y McEwen 1992).

El despliegue de la CL también depende de la vía de administración utilizada para los diferentes agentes, por ejemplo, la administración icv de hormona adrenocorticotrofa (ACTH; de Catanzaro y cols. 1981) y la hormona estimulante de melanocitos (MSH; Raible y Gorzalka

1986) inhiben la CE; mientras que su inyección sistémica la facilita (Wilson y Endersby 1979, Raible y Gorzalka 1986). Compuestos como la prolactina y el GABA al ser administrados vía icv, inhiben la CE (Dudley y cols. 1982, Qureshi y Eriksson 1988), mientras que al ser administrados directamente en la sustancia SGCM la facilitan (Harlan y Pfaff 1983, McCarthy y cols. 1991).

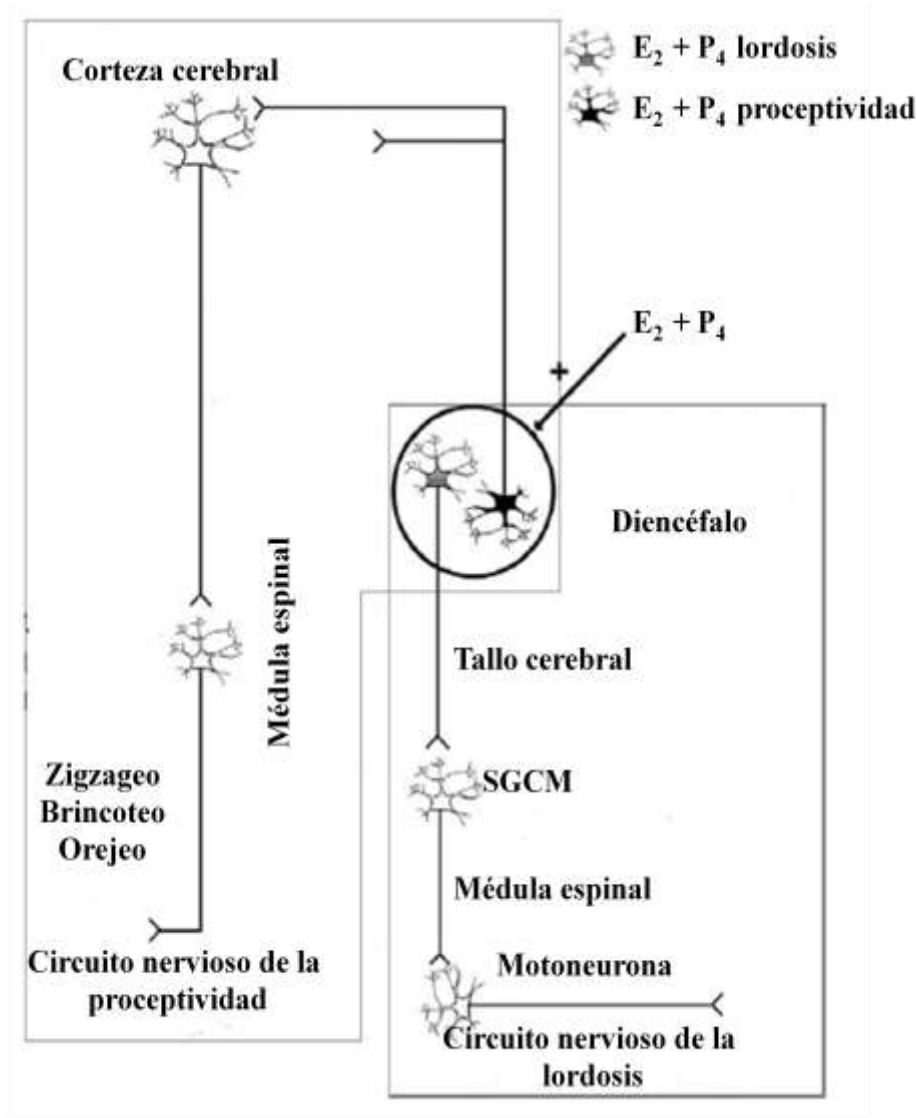


Figura 4. Diagrama que muestra posibles circuitos nerviosos sensibles a E_2 y P_4 que participan en el control de la lordosis y la proceptividad. E_2 = Estradiol; P_4 = Progesterona; SGCM = sustancia gris central mesencefálica. Modificado de Melo y cols. (2008).

Para los propósitos de esta tesis, a continuación se describen las acciones fisiológicas involucradas en la regulación de la CE tanto por la GnRH como por la leptina.

2.6. Hormona Liberadora de Gonadotrofinas (GnRH)

La GnRH fue inicialmente aislada en el hipotálamo de los mamíferos como un decapeptido (pGlu-His-Trp-Ser-Tir-Gli-Leu-Arg-Pro-Gli-NH₂; Baba y cols. 1971, Matsuo y cols. 1971, Schally y cols. 1971), caracterizándose al menos dos formas diferentes de GnRH en diferentes poblaciones de neuronas; la GnRH-I y la GnRH-II (Gestrin y cols. 1999, Latimer y cols. 2000). La GnRH-I es producida en el área preóptica y el hipotálamo mientras que las células que producen GnRH-II se encuentran en el cerebro medio, pero no en centros hipofisiotróficos del hipotálamo y el hipocampo de ratones (Gestrin y cols. 1999), ratas, humanos, monos (Millar 2005) y pollos (Miyamoto y cols. 1982). Además, estudios inmunohistoquímicos (Lehman y cols. 1986) y de radioinmunoensayo (Wheaton y cols. 1975), han mostrado que la eminencia media de los mamíferos es el área que contiene la mayor cantidad de GnRH, ya que aquí es donde se almacena para posteriormente ser liberada hacia la circulación portal y actuar en la adenohipófisis liberando a la LH y la FSH.

2.6.1. El receptor de la GnRH

Los receptores de GnRH (GnRHr) son receptores acoplados a proteínas G, constituidos por un dominio NH₂ terminal, seguido por siete dominios transmembranales (TMs) de tipo alfa hélices conectados por tres dominios extracelulares (DE) y tres dominios intracelulares (DI; ver Figura 5). Los dominios extracelulares y las regiones superficiales de los TMs son generalmente los sitios de unión de la GnRH, mientras que los dominios intracelulares interaccionan con proteínas G para llevar a cabo la señalización intracelular (Millar 2005).

2.6.2. Efecto de la GnRH sobre la CE

La GnRH tiene efectos importantes sobre la ovulación y la regulación de la CE (Moss y McCann 1975, Zadina y cols. 1981). Por ejemplo, se conoce que los niveles basales de GnRH se mantienen constantes desde el diestro hasta la mañana del proestro, ya que en la tarde de éste se produce un dramático aumento de sus niveles, motivo por el cual se ha propuesto que

contribuye en la facilitación de la CE (Moss y McCann 1973). Además, la inyección sistémica de GnRH facilita la lordosis en ratas hembras pretratadas con estrógenos de manera independiente a su efecto sobre la liberación de gonadotrofinas o corticoides suprarrenales (Moss y McCann 1973, Pfaff 1973). Además, la administración de fragmentos de GnRH directamente en el tercer ventrículo también se ha encontrado que facilitan la expresión de la CL (Moss y McCann 1973). Por otro lado, se han estudiado las regiones cerebrales en donde la GnRH ejerce su efecto facilitador sobre la CE.

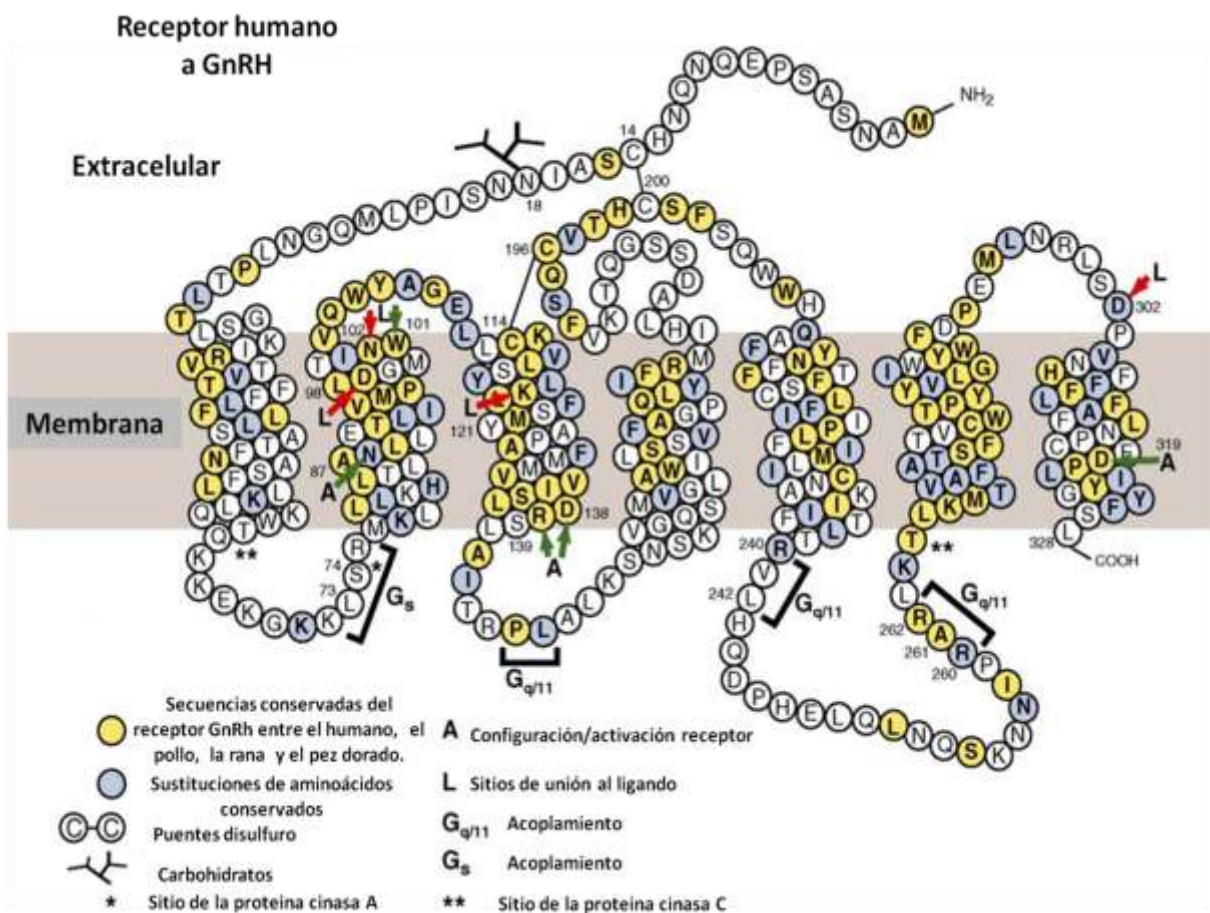


Figura 5. Representación bidimensional del receptor a GnRH, la cual muestra los aminoácidos conservados entre diversas especies de vertebrados (amarillo) y las sustituciones conservadas (azul). Se indican los presuntos sitios de unión al ligando y los residuos importantes en la configuración del receptor así como la activación del acoplamiento a proteínas G. También se muestran sitios de fosforilación y unión a puentes disulfuro. Tomado de Millar (2005).

Así, la administración de GnRH directamente en el APOm (Rodríguez-Sierra y Komisaruk 1982), en el HVM (Moss y Foreman 1976, Rodríguez-Sierra y Komisaruk 1982) y en la SGCM (Riskind y Moss 1979, Sakuma y Pfaff 1979b) induce la expresión de la CE en ratas previamente tratadas con E₂, sin embargo, la aplicación de un antisuero para la GnRH directamente en la SGCM, bloquea dicha conducta (Riskind y Moss 1983). No se conoce si la GnRH activa directamente a las neuronas de las áreas involucradas en la expresión de la CE o si modula la transmisión aferente a esas células. Sin embargo, estudios electrofisiológicos apoyan una acción de este péptido sobre dichas células, ya que la inyección iontoforética de la GnRH, *in vivo*, provoca tanto una respuesta tanto inhibitoria como excitatoria en las neuronas del HVM (Chan y cols. 1983), pero en las neuronas de la SGCM se ha observado principalmente una respuesta excitatoria (Samson y cols. 1980, Pan y cols. 1986).

Por otro lado, se ha descrito que la CE inducida por la GnRH pudiera deberse a la liberación de la noradrenalina, 5-hidroxiptamina, o bien al GABA en neuronas del APOm (Pan y cols. 1986, Pan y Gala 1988, Pan y cols. 1988) y de la SGCM (Ogawa y cols. 1992) y no por la acción directa de éste péptido. Esta idea ha sido apoyada debido a que el efecto facilitador de la GnRH sobre la lordosis en ratas pretratadas con estrógenos fue bloqueado por la administración de antagonistas α y β adrenérgicos (González-Mariscal y Beyer 1988).

El mecanismo celular involucrado en la facilitación de la CL por GnRH probablemente difiere del relacionado con la secreción de gonadotrofinas (Zadina y cols. 1981, Conn y cols. 1987). Por ejemplo, algunos análogos y fragmentos de la GnRH que inhiben la ovulación pueden facilitar la CE (Zadina y cols. 1981, Leung y Wang 1989). Además, la GnRH provoca la hidrólisis del fosfatidil inositol (PI; Leung y Wang 1989) y la activación de la proteína cinasa C (PKC) en células del hipotálamo (Conn y cols. 1987), lo cual podría sugerir la participación de este sistema en la facilitación de la CE por la GnRH. También, la GnRH estimula la secreción de gonadotrofinas al interactuar con receptores membranales acoplados al sistema de la adenilato ciclasa (Fraser 1979). Por consiguiente, es posible que la GnRH facilite la expresión de la lordosis aumentando los niveles de AMPc en neuronas relacionadas con la CL.

En apoyo a esta idea, nuestro laboratorio probó el efecto de dos inhibidores de fosfodiesterasas (enzima responsable de la inactivación del AMPc), la teofilina y la metil

isobutil xantina, sobre la lordosis inducida por la administración de diversas dosis de GnRH a ratas ovx pretratadas con E₂ (Beyer y cols. 1982). Así, ninguna de las dos xantinas, por sí solas, facilitó la CE en ratas pretratadas con BE. No obstante, la combinación de la GnRH (1 o 5 µg) con 2 mg de metil isobutil xantina, incrementó significativamente los niveles de AMPc y la CE. Por lo tanto, estos datos apoyan la idea de que la GnRH induce lordosis incrementando los niveles de AMPc en neuronas relacionadas con la expresión de la CE. Además, Beyer y cols. (1997) encontraron que la CE inducida por una dosis de 5 µg de GnRH era mediada por el receptor a progesterona, ya que la inyección sc de 5 mg de la antiprogesterina RU486 bloqueó dicho efecto conductual.

2.6.3. Antide, antagonista del receptor a GnRH-1

El antide es un decapeptido antagonista del receptor GnRH-1, denominado de tercera generación (Figura 6; Schally y Varga 1999). Este antagonista contiene un aminoácido ureidoalkyl-D en la posición 6, ausente en los demás antagonistas de la GnRH, que le permite mantener su potencia de inhibición y eliminar los efectos secundarios asociados a la liberación de histamina (Schally y Varga 1999). Su composición química es Acetil-d-Ala (2-naphtil)-d-Lys(N-nicotinoil)-d-Lis(N-nicotinoil)-Leu-Lis(N-isopropil)-Pro-d-Ala-NH₂, con un potente efecto antiovulatorio y escasa liberación de histamina (Danforth y cols. 1991). El antide muestra gran afinidad por el receptor GnRH-1, impidiendo la activación de los procesos intracelulares inducidos por la GnRH (Kauffman y Rissman 2004).

El antide causa inmediata y reversible supresión de la liberación de gonadotrofinas sin inducir un efecto estimulador inicial (Reissmann y cols. 1995). El mecanismo de acción de los antagonistas de la GnRH (Figura 7) se lleva a cabo por inhibición competitiva con la GnRH por su receptor (Huirne y Lambalk 2001).

2.6.4 Utilización del antide como herramienta farmacológica para explorar la participación del GnRH-1 sobre la expresión de la CE

El antide ha sido utilizado para estudiar si el receptor GnRH-1 participa en la regulación de la CE. Así, experimentos realizados en por Kauffman y Rissman (2004) mostraron que la administración icv de antide a hembras de ratones ovx pretratadas con estrógenos, bloqueó la

CE inducida por GnRH, lo que demuestra la participación del GnRH-1. Posteriormente, Gómora-Arrati y cols. (2008) utilizando el modelo de la rata ovx pretratada con BE demostraron que la CE inducida por la estimulación vaginocervical, así como de algunas progestinas reducidas en el anillo A (5α -DHP, 5α , 3α -Pgl y la $5\beta,3\beta$ -Pgl) era mediado por la liberación de la GnRH, ya que la administración del antide bloqueó dicho efecto conductual.

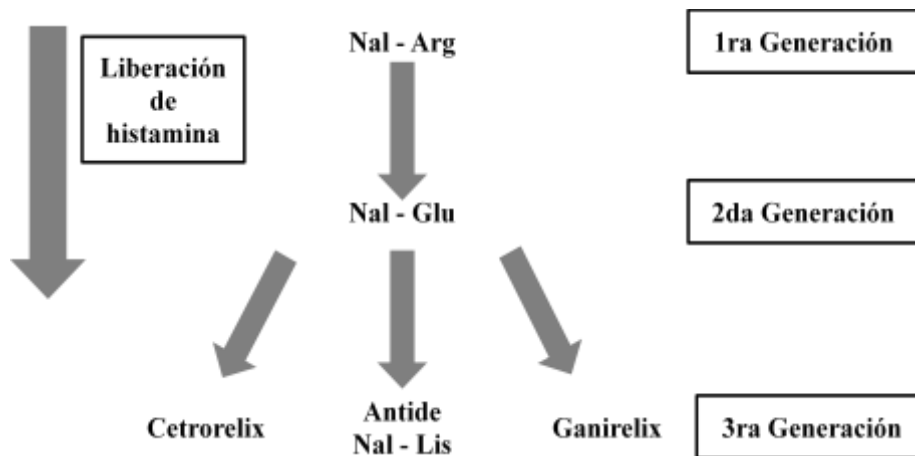


Figura 6. Evolución de los antagonistas de la GnRH. El progreso en las generaciones de antagonistas del receptor a GnRH permitió incrementar su efecto inhibitor de gonadotrofinas mientras que se disminuyó la liberación de histamina.

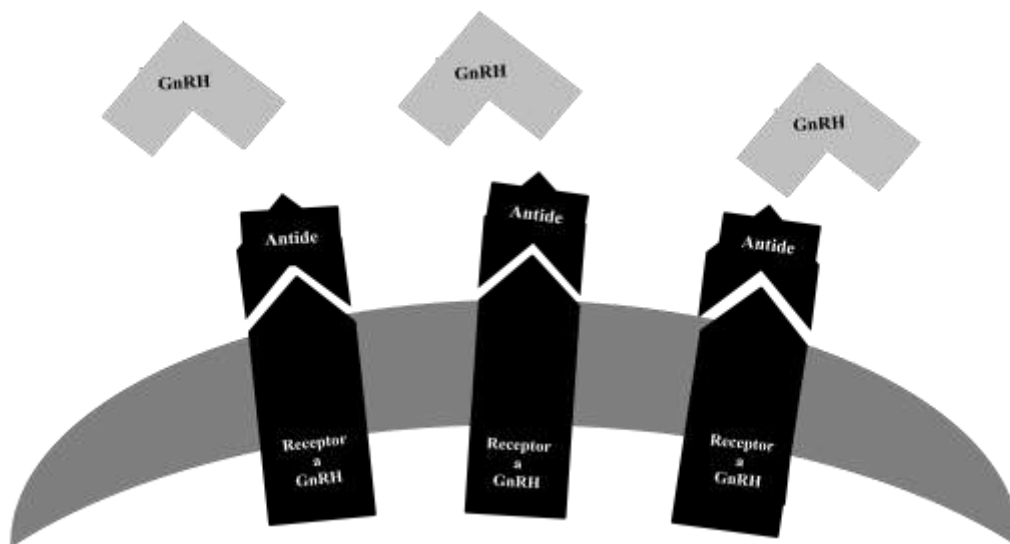


Figura 7. Mecanismo de acción del antide. El antide compite con la GnRH por la unión con su receptor ubicado en la membrana celular.

2.7. El receptor intracelular de la Progesterona (P₄)

Diversos estudios realizados en el útero, la hipófisis y posteriormente en estructuras cerebrales, han mostrado que la P₄ ejerce la mayoría de sus efectos a través de unirse con el RP (Philibert y Raynaud 1973, Blaustein y Feder 1979, O'Malley y cols. 1991). La caracterización y distribución tisular de este receptor se ha realizado mediante la utilización de la progestina sintética, R5020 (17, 21-dimetil-19-nor-2,9-pregnandien-3-20 diona), la cual es una hormona que se disocia más lentamente del RP que la propia P₄ (Philibert y Raynaud 1973, Philibert y cols. 1977) por lo que forma un complejo hormona-receptor más estable.

Además, con el uso del 3H R5020 se ha detectado la presencia de RPs citoplásmicos en una variedad de órganos (Mobbs y Liu 1990, Boivin y cols. 1994) como; útero, hipófisis, hipotálamo, área preóptica, amígdala, corteza cerebral y mesencéfalo en diferentes especies de mamíferos (Kato y Onouchi 1977, Moguilewsky y Raynaud 1979, McLusky 1980). Sin embargo, en el SNC, el RP no sólo ha sido detectado en las neuronas, sino también en células gliales, principalmente en oligodendrocitos (Jung-Testas y cols. 1992) y en meningiomas cerebrales (Carroll y cols. 1993). Con métodos bioquímicos e inmunocitoquímicos se han caracterizado dos poblaciones del RP en el sistema nervioso central (SNC) de roedores (MacLusky y McEwen 1978); una localizada en el hipotálamo la cuál es regulada por estrógenos y otra ampliamente distribuida en la amígdala, cerebelo y corteza cerebral (McLusky 1980, Camacho-Arroyo y cols. 1994) y no modificada por los estrógenos. Por otro lado, se conoce que los estrógenos inducen la síntesis del RP en varios tejidos (MacLusky y McEwen 1978, Kastner y cols. 1990) ya que se ha detectado un aumento considerable en las concentraciones del RP uterino a las 24 horas después de haber administrado E₂ a cuyos ovx.

Cabe señalar que en la coneja adulta los estrógenos inducen la transcripción de RPs en el útero, hipotálamo y corteza cerebral (Camacho-Arroyo y cols. 1994). Sin embargo, no existe una relación directa entre la expresión del gen y la síntesis de los RPs en respuesta a los estrógenos, lo cual sugiere la existencia de un control diferencial a nivel postranscripcional en diferentes tejidos (Shughrue y cols. 1997).

Estudios iniciales mostraron que la P₄ al unirse con su receptor en el citoplasma se podía translocar hacia el núcleo (Blaustein y Feder 1980, McGinnis y cols. 1981, Rainbow y cols. 1982) para unirse a la cromatina y modificarla (Perrot-Applanat y cols. 1986). Sin embargo,

estudios más recientes con métodos inmunocitoquímicos en células del estroma uterino, demostraron que los RPs, incluso en ausencia de su ligando natural (la P_4), se encuentran unidos laxamente a la cromatina nuclear, y no en el citoplasma como inicialmente se pensaba (Lange 2004, Mani y Portillo 2010). Sin embargo, los receptores de glucocorticoides y de andrógenos se encuentran exclusivamente en el citoplasma y el hecho de que en esos estudios iniciales se hayan encontrado a los RPs en el citoplasma se debió a un problema artefactual debido a que los RPs pueden moverse del núcleo al citoplasma durante el proceso de homogenizado de las células.

2.7.1. Características estructurales y farmacológicas del RP

El RP posee las mismas propiedades físico-químicas que los receptores clásicos de esteroides, como son; alta afinidad, saturabilidad y especificidad, además de que pertenece a la familia de los receptores intracelulares que median los efectos nucleares de hormonas esteroidales, tiroideas y de las vitaminas A y D (Figura 8). Actualmente, se han clonado tres isoformas del RP, tanto en células de humanos como de pollos; la isoforma A (RP-A) la B (RP-B) y la C (RP-C), con 94, 114 y 60 kilodaltones, respectivamente (Horwitz y Alexander 1983, McDonnell 1995).

La clonación y caracterización de los ADNs complementarios de cada uno de estos tipos de receptores, indican que la RP-B contiene un fragmento adicional de 164 aminoácidos en el N-terminal ausente en la RP-A (Kato y Onouchi 1979, Misrahi y cols. 1987), por lo que, la RP-A es esencialmente una versión troncada de la RP-B ya que se origina del mismo gen. A través de esta misma técnica, en el RP humano y del pollo (Conneely y cols. 1987, Misrahi y cols. 1987) se pudieron caracterizar diferentes regiones del receptor como: a) el dominio de unión al ADN, que muestra de 99-100% de conservación entre los receptores a esteroides y consta de 70 aminoácidos aproximadamente, en donde se localizan dos pliegues de aminoácidos denominados dedos de zinc. Este dominio interacciona con secuencias de ADN específicas conocidas como “*elementos de respuesta a la P_4* ”; b) el dominio de unión del ligando, el cual contiene alrededor de 250 aminoácidos y se ubica en el extremo carboxilo terminal de la molécula. Este dominio, además de unirse con la hormona, interacciona con un complejo oligomérico de proteínas de alto peso molecular denominadas proteínas de choque térmico

(HSPs de sus siglas en inglés) 90,72 Y 59. Cabe señalar que en esta región se producen los procesos de transactivación y dimerización que son dependientes de la unión con la hormona; c) la región de la bisagra, es una zona que muestra pobre homología entre los distintos receptores a esteroides, se localiza entre el dominio de unión al ligando y el dominio de unión al ADN, y es una región en donde se encuentran las señales de localización nuclear; d) la región del amino terminal, esta zona varía mucho en su tamaño y composición de aminoácidos entre los receptores a esteroides. En esta región se llevan a cabo la mayoría de las fosforilaciones que se producen en los residuos de serina del receptor (en las posiciones 102, 294, 345) y que son a través de diferentes proteínas cinasas, incluyendo la cinasa activada por mitógeno (MAPK; serina 294), la caseína cinasa II (CKII; ser 81) y la cinasa dependiente de ciclina (cdK2; serina 25, 162, 190, 213, 400, 554, Y 676; Lange 2004, Hagan y cols. 2009).

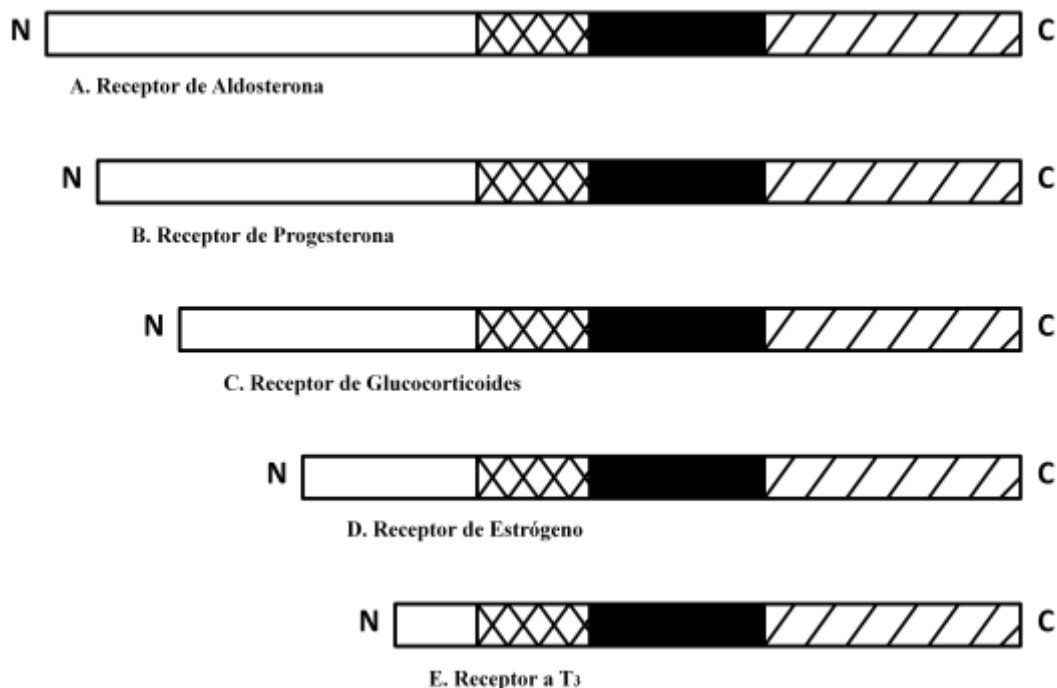


Figura 8. Representación esquemática de los receptores nucleares en donde se muestra un extremo carboxilo terminal que contiene; un dominio de unión al ácido desoxirribonucleico (ADN; cuadrulado) conservado que tiene 70 aminoácidos que forman dos dedos de zinc. Un dominio de unión al ligando (líneas diagonales) con 250 aa., que en ausencia del ligando se une a diversas proteínas de choque térmico (HSPs). La región de la bisagra (negro) muy variable en el contenido de aa. La región del N terminal (en blanco) con propiedades de transactivación de genes. La región del carboxilo terminal (C). Triyodotironina (T₃).

Por otro lado, la disección molecular de la estructura del RP ha permitido detectar la presencia de una región dentro del dominio de unión al ligando denominada función de activación dependiente del ligando 2 (AF-2 de sus siglas en inglés), la cual permite la interacción del RP con la maquinaria transcripcional. Otro dominio ha sido localizado en el extremo carboxilo terminal denominado función de transactivación 1 (AF-1 de sus siglas en inglés) y otro en el extremo N terminal denominado función de activación 3 (AF-3 de sus siglas en inglés), solo presente en la isoforma B. La AF-1 modula la especificidad del receptor con los sitios promotores del ADN ya que interactúa con componentes del complejo transcripcional del núcleo y proteínas correguladoras (Bai y Weigel 1995). Mientras que la AF-3 puede funcionar de manera independiente o sinergizar con la activación o desactivación de la AF-1 y AF-2 (Horwitz y cols. 1996). La isoforma C no contiene el dominio N terminal, por lo que no contiene a la AF1, la AF3 y el primer dedo de zinc del dominio de unión al ADN (Wei y cols. 1990).

Estudios realizados en ratones carentes del gen (*knock out*) para las diferentes isoformas del RP sugieren que la RP-A desempeña un papel crucial para que se lleve a cabo el fenómeno de la decidualización del estroma uterino antes de la implantación (Mulac-Jericevic y cols. 2000). Además, inhibe la hiperplasia del útero inducida por estrógenos, quizá por impedir los efectos proliferativos que se conocen que pueden ser inducidos por la RP-B (Mulac-Jericevic y Conneely 2004). En el endometrio humano la expresión de estos receptores cambia a lo largo del ciclo menstrual (Feil y cols. 1988).

Por otro lado, se han descrito efectos diferenciales de estas isoformas en algunos eventos reproductivos, por ejemplo, utilizando a ratones *knock out* para la RP-B (Conneely y cols. 2003, Mulac-Jericevic y Conneely 2004), se ha encontrado que la ovulación no se ve afectada, por lo que se puede interpretar que la RP-A es quien regula este efecto, más sin embargo, las glándulas mamarias que expresan la RP-B muestran una proliferación de dicha glándula para que se produzca un adecuado desarrollo de la misma.

Esta observación se ve apoyada en los ratones que no expresan la isoforma A, ya que en ellos se produce un desarrollo normal de esa estructura (Mulac-Jericevic y cols. 2000). En cuanto a los efectos producidos por la RP-C, se sabe que no funciona como un factor de transcripción independiente, pero puede interactuar con las otras dos isoformas para modular

su actividad transcripcional (Wei y cols. 1996).

Anteriormente, se pensaba que en ausencia de la hormona, el RP se localizaba en el núcleo de la célula blanco unido a las HSPs y probablemente a otras proteínas (Bagchi y cols. 1991, Pratt y cols. 1992). Sin embargo, con estudios de gradientes de sacarosa se ha mostrado que el RP migra como un complejo heteroligomérico (8S) unido a las, HSP 90, HSP 57, otra HSP 72 y quizás algunas otras (Smith y cols. 1990), condición que hace que el receptor sea incapaz de unirse al ADN e inducir la transcripción de genes responsivos a P_4 . Además, se sabe que la RP-B se encuentra dinámicamente viajando del núcleo al citoplasma y viceversa, mientras que la RP-A preferentemente se mantiene en núcleo celular (Lange 2004, Lange y cols. 2007, Lange 2008).

La unión de la P_4 con el RP provoca los siguientes eventos: 1) disociación de las proteínas HSP 90 y HSP 57, que interfieren con la unión del RP al ADN; 2) cambio del coeficiente de sedimentación, de 8S a 4S, lo que demuestra la pérdida de algunos componentes que estaban asociados a la forma 8S; 3) Cambio alostérico, que es inducido únicamente por la P de manera independiente a la liberación de las HSPs; 4) Cambio covalente, como consecuencia de la fosforilación de sitios específicos y 5) dimerización con diferentes monómeros.

Finalmente, en células donde la RP-B y la RP-A son coexpresadas, tres distintos tipos de dímeros pueden formarse (A:A, A:B y B:B). Estos dímeros, cuando no están asociados a las HSPs, son capaces de interactuar con gran afinidad sobre elementos específicos que responden a la P_4 dentro de los sitios promotores en los genes blanco (Ariens 1964, Beato y Sánchez-Pacheco 1996).

2.7.2. El RP como una fosfoproteína

La fosforilación de proteínas consiste en la incorporación de grupos fosfatos en residuos de aminoácidos que contienen en su cadena lateral radicales hidroxilo (OH), como la serina, treonina y tirosina. Los receptores de esteroides, como la mayoría de las proteínas, muestran esa característica y pueden ser fosforilados en múltiples sitios en donde se localicen dichos aminoácidos, por lo que han sido considerados como fosfoproteínas, que al ser fosforiladas se producen modificaciones covalentes que provocan la regulación de la mayoría de los procesos metabólicos.

La fosforilación del RP se ha demostrado en sistemas libres de células (Denner y cols. 1990, O'Malley y cols. 1991, Poletti y cols. 1993) y tejidos en una variedad de condiciones fisiológicas. En estos sistemas, actualmente se ha mostrado que el RP es fosforilado en 14 residuos de serina por diversas proteínas cinasas (Denner y cols. 1990, O'Malley y cols. 1991). Una de estas fosforilaciones se ha localizado en la serina 211 y 260 del dominio N-terminal del RP del pollo, aún en ausencia de la hormona. Otros sitios de fosforilación se localizan en las serinas 367 y 530 de la región de la bisagra, los cuales son hiperfosforilados en presencia de la hormona.

Por otro lado, el RP humano es fosforilado al menos en siete residuos de serina localizados en el dominio N terminal del receptor (Weigel y cols. 1995, Zhang y cols. 1995, Zhang y cols. 1997). Tres sitios de serina (81, 102 y 162) se encuentran en el segmento completo del N terminal de la RP-B, mientras que los otros se localizan en las serinas (190, 294, 345 y 400) de la RP-B y N terminal truncada de la RP-A.

La fosforilación del RP provoca los siguientes efectos: a) contribuye en diferentes procesos transcripcionales como en la interacción con proteínas correguladoras (Rowan y O'Malley 2000, Rowan y cols. 2003); b) Regula la activación transcripcional del RP tanto ligando dependiente como ligando independiente (Labriola y cols. 2003); c) La migración del receptor (Lange y cols. 2000); d) La fosforilación de la serina 294 del RP, independiente del ligando, por la MAPK, induce la translocación del receptor al núcleo, además de servir de señal para que se ubiquitinice y se provoque la degradación del RP por medio del proteosoma 26S (Qiu y Lange 2003); e) La fosforilación del RP independiente del ligando puede regular a los genes por una vía de mecanismos no clásicos, por ejemplo, el grupo de Bamberger y cols. (1996) demostró que existe actividad transcripcional ligando independiente del RP.

2.7.3. Correlación entre la concentración del RP y la expresión de la CE en roedores

Se conoce que la administración de estrógenos induce la expresión de RP en las áreas cerebrales (HVM y APOm) relacionadas con la expresión de la CE en roedores (MacLusky y McEwen 1978, McEwen y cols. 1978, Moguilewsky y Raynaud 1979, Etgen 1984). Existe abundante información en donde se ha investigado la existencia de una posible correlación temporal entre la inducción del RP por estrógenos y la aparición de la CE disparada por la

inyección de P₄ (Ahdieh y cols. 1986). Así, Moguilewsky y Raynaud (1979) demostraron que, en ratas ovx tratadas con E₂, los niveles máximos de CE inducida por la inyección de P₄ coincidían con los del RP hipotalámico, mientras, que la exposición al BE por sólo 12 horas era inefectiva tanto para inducir lordosis como para aumentar los niveles del RP. Sin embargo, alargando el periodo de tiempo de 24 a 48 horas, después del pretratamiento con BE, se encontró una alta concentración de RPs sintetizados.

Otros estudios mostraron que tanto en el HVM, el APOm así como en la hipófisis, existe una correlación temporal entre la inducción del RP y la aparición de la CE en la rata. Así, en estudios realizados mediante la utilización del 3H R5020 como marcador de unión con el RP (Parsons y cols. 1982), se encontró que tanto el inicio como la desaparición de la CE inducida por P₄, coincidía con la aparición y desaparición del RP después del implante y la remoción de E₂ respectivamente. En otro estudio realizado por Blaustein y Feder (1980), se encontró que la aparición del RP en el HVM y en el APOm precede al inicio de la CE inducida por P₄ en hembras de cuyas pretratadas con estrógenos, habiendo una reducción de los RPs nucleares durante la inhibición secuencial de la CE. También se mostró que altas concentraciones de P₄ se translocan de los RPs del citoplasma hacia el núcleo celular de las neuronas del APOm y del HVM. De este modo, se demostró la existencia de una correlación entre la activación del receptor (uniéndose a la cromatina) y el disparo de la CE inducida por P₄ (Blaustein 1982).

La utilización de oligonucleótidos antisentidos para el RP ha sido una herramienta molecular para poder demostrar la participación de esta proteína en diferentes procesos reproductivos. Estos compuestos pueden tener diferentes mecanismos de acción, por un lado, interferir con la síntesis del RP bloqueando la transcripción de los ARNs mensajeros que llevan la información que codifica para estos receptores, o bien utilizando oligonucleótidos dirigidos para bloquear a la traducción del ARN para el RP. Así, la inyección de estos compuestos directamente en el HVM de hembras ovx, inhibe significativamente la CE inducida por P₄ (Pollio y cols. 1993). Además, este oligonucleótido antisentido también fue muy efectivo en reducir la CE cuando se aplicó a las 12 pero no a las 24 horas después del E₂, concomitantemente, las conductas proceptivas, que se ha propuesto que son fuertemente dependientes de P₄, también fueron suprimidas (Pollio y cols. 1993). Mani y cols. (1994b), administraron directamente en el tercer ventrículo de ratas pretratadas con estrógenos, tanto

los oligonucleótidos antisentido como los sentido, para la secuencia de ADN que codifica al RP, encontrando que tanto la proceptividad como la receptividad inducidas por P₄ fueron suprimidas en animales tratados con oligonucleótidos antisentido. Sin embargo, los animales que recibieron el oligonucleótido sentido continuaron expresando CE normal.

Ensayos *in vitro*, mostraron que la administración del antisentido redujo en un 52.2% la concentración del RP en el HVM, sugiriendo que los niveles umbrales del RP hipotalámico inducido por estrógenos son cruciales en la regulación de la CE disparada por P₄ en roedores.

Recientemente, datos obtenidos por nuestro grupo de investigación (Guerra-Araiza y cols. 2009), indican que la administración tanto de oligonucleótidos antisentido como sentido para las isoformas A y B del RP, muestran un papel diferencial de dichas variantes del RP sobre la conducta de estro inducida por progesterona y por las progestinas reducidas en el anillo A (5 α -DHP y 5 β ,3 β -Pgl). Los resultados mostraron un efecto diferencial de la RP-B con respecto a la RP-A sobre la expresión de la CE inducida por progesterona y sus metabolitos reducidos en el anillo A, ya que la administración de oligonucleótidos antisentido para la RP-B, bloquearon la inducción de la CE.

2.7.4. Características estructurales y farmacológicas del RU486

En la década de los 80s se descubrió un antagonista del RP con alta actividad antiglucocorticoide denominado RU486 (Herrmann y cols. 1982, Moguilewsky y Philibert 1984, Rauch y cols. 1985). Este compuesto es derivado de la 19-nortestosterona (Larner y cols. 2000), su estructura es 11 β -(-4-dimetil-amino fenil)-17 β -hidroxi-17 α -(prop-1-inil)-estra-4-9-dien-3-ona (mifepristona es su nombre genérico), que no presenta el grupo metilo en el carbono 19 (C19) presente en la molécula de P₄ y glucocorticoides (Figura 9).

El RU486 muestra gran afinidad por el RP, impidiendo que ésta proteína inicie el proceso de transcripción (Baulieu 1991). Dicha antiprogestina se une con gran afinidad al receptor de glucocorticoides (Baulieu 1991, Beck y cols. 1993), siendo ampliamente utilizada para explorar la participación del RP sobre la expresión de la CE en roedores (Brown y Blaustein 1984, 1986).

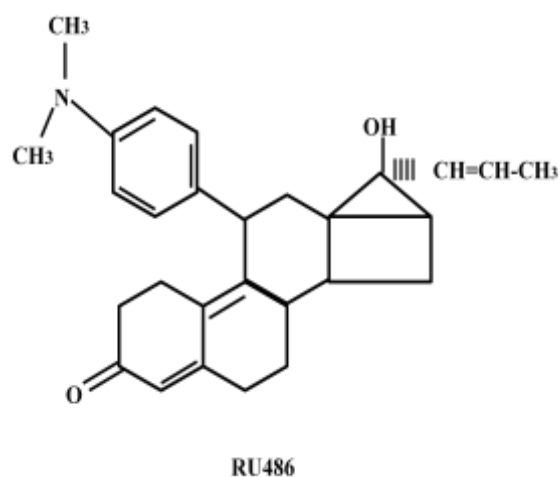


Figura 9. Estructura química del RU486. 17β-hidroxi-11β-(4-dimetil-aminofenil)-17α-(prop-1-inil). Nótese que no presenta el grupo metilo en el carbono 19 (C19) presente en la molécula de P₄.

2.7.4.1. Mecanismo de acción del antagonista RU486

A continuación se describen los mecanismos que se han propuesto para explicar los efectos antagónicos del RU486 que ejerce sobre el RP: a) compite con la P₄ por unirse al RP, sin embargo, lo hace en distintos sitios del dominio de unión al ligando que el ligando natural (Vegeto y cols. 1992); b) se ha observado que el RU486 puede inducir dimerización del RP así como una mayor unión del RP con el ADN que los agonistas del RP (Skafar 1991, DeMarzo y cols. 1992), haciendo contacto en bases específicas con los elementos de respuesta a la P₄ (PREs; Chalepakis y cols. 1988, Kuhnel y cols. 1989).

A pesar de que el RU486 promueve la unión del RP a los PREs tanto *in vitro* como *in vivo* no se ha encontrado que promueva la síntesis de proteínas de la misma manera en que los hace la propia P₄ (Edwards y cols. 1993); c) alteración en la conformación del dominio de unión al ligando, el RU486 inhibe el reclutamiento de coactivadores en el extremo carboxilo terminal del RP. Este cambio de conformación inactiva a la AF-2 y no permite la interacción con coactivadores (Onate y cols. 1995). Sin embargo el cambio conformacional inducido por el RU486, provoca el reclutamiento de una serie de correpresores como el correpresor receptor nuclear, el cual interactúa con el complejo RU486-RP (Jackson y cols. 1997) impidiendo la unión de este complejo con los sitios de unión en el ADN; d) bloquea la interacción de los

dominios amino y carboxilo terminal del RP. La activación del RP requiere una acción sinérgica entre la AF-1 y la AF-2 del RP (Meyer y cols. 1990). Así, mediante experimentos *in vitro* se ha demostrado que el RU486 impide la interacción entre el dominio N terminal y la región de la bisagra del RP (Tetel y cols. 1999). Estos datos sugieren que, adicionalmente al bloqueo de la unión a la AF-2, la conformación alterada en el dominio de unión al ligando inducida por el RU486 puede contribuir a la inactivación del receptor por interferir con la asociación física entre los dominios amino y carboxilo terminal.

2.7.4.2. Antiprogestinas como herramientas farmacológicas utilizadas para explorar la participación del RP sobre la expresión de la CE

El RU486 ha sido utilizado para estudiar el posible mecanismo de acción de la P₄ y de otros agentes capaces de inducir CE. Por ejemplo, experimentos iniciales, mostraron que el RU486, administrado por vía sistémica o icv a ratas y cuyos estrogénizados, bloqueó la CE inducida por P₄ (Brown y Blaustein 1984, González-Mariscal y cols. 1989, Beyer y cols. 1995). Este efecto inhibitorio del RU486 se produce en las mismas áreas cerebrales involucradas en la expresión de la CE inducida por P₄ (el HVM y el APOm) ya que la administración de cristales de RU486 en el HVM, una hora antes de la inyección sistémica de 200 µg de P₄, redujo la respuesta de lordosis en la mayoría de las hembras de cuyas probadas. Además, implantes del RU486 en la habénula, también inhibieron la lordosis inducida por P₄, pero con menos efectividad que la administración intrahipotalámica. Sin embargo, implantes de la antiprogestina en la región interpeduncular o en el APOm, no mostraron un efecto claro (Etgen y Barfield 1986). Por otro lado, microdepósitos oleosos de RU486 en el APOm, bloquearon la CE inducida por la administración de P₄ y algunos de sus metabolitos reducidos en el anillo A (González-Mariscal y cols. 1989). La inyección por vía icv del RU486 o del ZK98299 (antagonista del RP) una hora antes que la P₄, también suprime la respuesta conductual normalmente observada a los 30 y 180 minutos después de la administración de la P₄ (Mani y cols. 1994a). Además, la inyección por vía sc de RU486 también bloquea la CE, por ejemplo, datos obtenidos en nuestro laboratorio indican que la administración sc de RU486 inhibe la CE inducida por GnRH, PGE₂ y AMPc (Beyer y cols. 1997). Así también, González-Flores y cols. (2008) demostraron que la administración sc de RU486 bloquea la

CE inducida por la estimulación vagino-cervical y por progestinas reducidas en el anillo A.

2.8. Leptina

La leptina es una hormona de naturaleza proteica sintetizada por el gen Ob y secretada principalmente por el tejido adiposo (Zhang y cols. 1994). El gen Ob fue descubierto en el cromosoma 6 en el ratón y en el cromosoma 7 en humanos (Zhang y cols. 1994), mediante la técnica de clonación posicional, en donde se encontró una secuencia de transcripción del ARNm de 4.5 kb con una lectura abierta altamente conservada de 167 aa (Zhang y cols. 1994). Además, este gen contiene 650 kilobases y consiste de tres exones separados por 3 intrones. La región que codifica para la leptina se localiza en los exones 2 y 3.

Por otro lado, diferentes análisis estructurales indican que la leptina posee características moleculares similares a los miembros de la familia de las citocinas helicoidales de cadena larga (Madej y cols. 1995, Fruhbeck y cols. 1998). Por lo tanto, la estructura tridimensional de los 167 aminoácidos de su molécula forma cuatro hélices alfa antiparalelas conectadas por dos grandes cruzamientos y un asa corta en el lado izquierdo de la hélice empacada en una bicapa. También, contiene un puente disulfuro entre dos residuos de cisteína del carbono terminal de la leptina y el comienzo de una de las asas. Ésta estructura es de crucial importancia para el plegamiento y la unión a su receptor (Madej y cols. 1995, Kline y cols. 1997, Fruhbeck y cols. 1998).

2.8.1. Regulación de la expresión de leptina

La expresión de leptina es influenciada por la cantidad de energía almacenada en el tejido adiposo. Por ejemplo, en humanos y otros mamíferos obesos, existe un incremento del ARNm de los Ob-R en el tejido adiposo y de los niveles séricos de leptina (Lonnqvist y cols. 1995, Maffei y cols. 1995). Además, el tamaño de los adipocitos es determinante para la síntesis de leptina, ya que los adipocitos más grandes contienen más leptina (Hamilton y cols. 1995). Por lo tanto, los niveles de leptina en sangre están correlacionados con las reservas totales de grasa corporal (Maffei y cols. 1995). Asimismo, en humanos y roedores se ha observado que los niveles de leptina aumentan a las pocas horas después de comer y de varios días de sobrealimentación (Saladin y cols. 1995), sin embargo, los niveles de leptina disminuyen a las

pocas horas después del inicio del ayuno en ambas especies (Frederich y cols. 1995, Saladin y cols. 1995, Boden y cols. 1996). Así, la leptina sirve como un indicador del almacenamiento de energía y como un mediador del balance energético, ya que los cambios en la expresión de leptina en respuesta al ayuno y a la alimentación no son proporcionales a los cambios correspondientes en el peso o grasa corporal (Frederich y cols. 1995, Boden y cols. 1996).

La secreción de leptina puede ser mediada por las concentraciones de insulina, ya que la leptina aumenta después del pico de secreción de insulina durante el ciclo de la alimentación (Saladin y cols. 1995, Sinha y cols. 1996). Además, los niveles de leptina son regulados por otros factores hormonales, como los glucocorticoides, quienes estimulan directamente la síntesis de leptina en cultivos de adipocitos (Murakami y cols. 1995). Cabe resaltar que en humanos la expresión de leptina se incrementa en respuesta a la elevación crónica de cortisol (Cizza y cols. 1997), sin embargo, en animales esta relación es inversamente proporcional (Ahima y cols. 1996, Licinio y cols. 1997). Otros de los mediadores químicos de la leptina son las hormonas tiroideas (T_3 y T_4), las cuales disminuyen los niveles de leptina en roedores (Escobar-Morreale y cols. 1997).

Por otro lado, la síntesis de leptina es estimulada por infección, endotoxinas y citocinas, por ejemplo, factor de necrosis tumoral α (TNF- α de sus siglas en inglés), factor inhibidor de leucemia (LIF de sus siglas en inglés) e interleucina 1 (IL-1) (Grunfeld y cols. 1996, Bornstein y cols. 1998). Además, la alimentación y la administración de colecistocinina o gastrina disminuyen la síntesis de leptina en el *fundus* gástrico e incrementa la leptina plasmática (Bado y cols. 1998, Wang y cols. 1998a). Por último, la infusión de glucosamina incrementa dicha expresión en el tejido adiposo e induce nuevamente la síntesis de leptina en el músculo esquelético (Wang y cols. 1998a).

2.8.2. Receptores de leptina

Existen diferentes isoformas de los receptores de leptina que pertenecen a la familia de los receptores a citocinas tipo I (Bazan 1990, Tartaglia y cols. 1995). Los miembros de esta familia tienen regiones extracelulares características de cuatro residuos de cisteína (Bazan 1990) y un número diferente de dominios de fibronectina tipo III.

Se han clonado seis isoformas del Ob-R producidas por el gen db (gen que codifica para la

síntesis de las distintas isoformas del receptor a leptina), estas son; 1) Ob-Ra, 2) Ob-Rb, 3) Ob-Rc, 4) Ob-Rd, 5) Ob-Re y 6) Ob-Rf (Lee y cols. 1996, Wang y cols. 1998b), que tienen en común un dominio extracelular de 800 aa, así como un dominio transmembranal de 34 aa y con un dominio intracelular variable (Figura 10). Estas isoformas pueden ser divididas dentro de tres clases; cortas, largas y secretadas. Las secretadas contienen un dominio extracelular y transmembranal idéntico, mientras que las isoformas cortas y largas presentan similitudes en los primeros 29 aa. Las formas cortas del receptor, ej., Ob-Ra, OB-Rc, OB-Rd, OB-Rf contienen de 30 a 40 residuos citoplasmáticos. Sin embargo, la forma larga del receptor posee un dominio intracelular de aproximadamente 300 aa, con secuencias necesarias para la interacción con otras proteínas y sus subsecuentes vías de activación (Tartaglia y cols. 1995).

Por otro lado, existe una variación en la distribución de las diferentes isoformas del Ob-R en el hipotálamo, así, la isoforma Ob-Ra y la OB-Rc se expresan principalmente en el plexo coroideo y en las microvénulas, en donde se ha sugerido que pueden transportar la leptina hacia el líquido cerebrospinal (Hileman y cols. 2000, Bjorbaek y Kahn 2004). En cambio, la Ob-Re, la cual carece de dominio intracelular, puede ser una isoforma soluble y por lo tanto se encuentra en la circulación (Lee y cols. 1996), por lo que existen reportes, en ratones, de que esta isoforma es producida en cantidades suficientes para actuar como un buffer de la leptina libre circulante (Lollmann y cols. 1997).

2.8.3. Vía de señalización intracelular activada por leptina

Diversos estudios han mostrado que solo la Ob-Rb contiene las secuencias específicas para la activación de la vía de señalización de las proteínas Janus cinasa (JAK)/Señales transductoras activadoras de la transcripción (STAT; Bjorbaek y Kahn 2004, Myers 2004). Esta vía comprende una familia de cuatro tirosina cinasas JAK, y siete factores de transcripción de 85 a 95 Kilodaltones STAT, que son regulados al ser fosforilados en diferentes residuos de serina y tirosina. Funcionalmente, los receptores a citocinas contienen una secuencia conocida como “*box1*”, rica en prolina, que es requerida para la interacción y activación de la JAK (Ihle y Kerr 1995), y una secuencia menos conservada llamada “*box2*”, que también juega un papel en la interacción con la JAK y la selectividad de la isoforma.

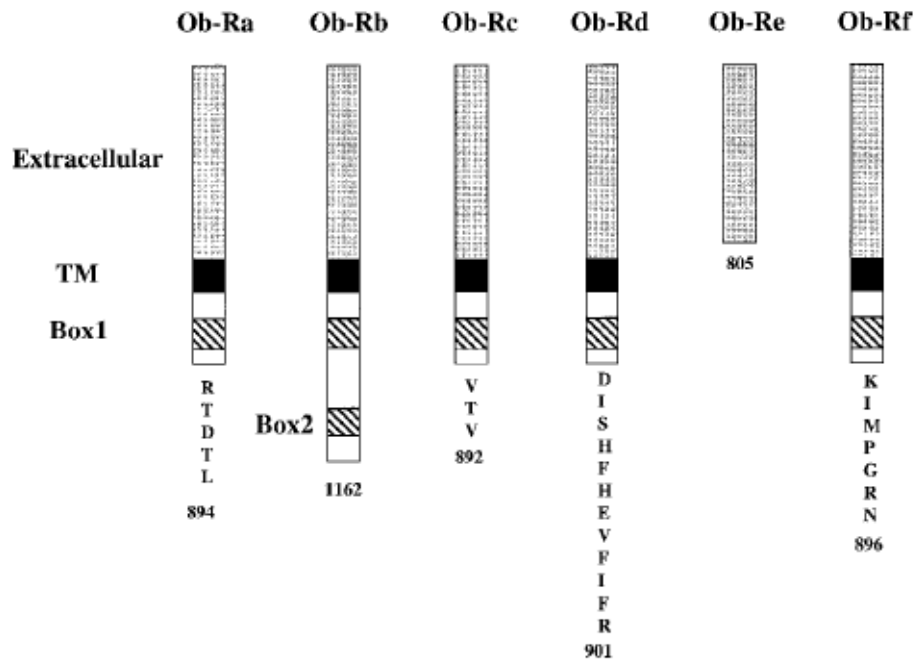


Figura 10. Estructura de las diferentes isoformas de los receptores a leptina. Todas las isoformas del Ob-R poseen un dominio extracelular común de unión al ligando, pero difieren en el extremo carboxilo terminal (dominio intracelular). Únicamente la Ob-Rb, la isoforma larga, tiene todos los motivos proteicos intracelulares necesarios para la vía de señalización de la Janus cinasa (Jak)- Señales transductoras activadoras de la transcripción (STAT). Los residuos de los aa terminales de las distintas isoformas Ob-R están denotadas por el código alfabético. La Ob-Re carece de un dominio transmembranalTM así como de los motivos proteicos intracelulares. Los dominios intracelulares Box1 y Box2 están indicados por los cuadros con diagonales. Tomada de Bjorbaek y cols. (2004).

Debido a que las distintas isoformas del Ob-R no contienen un dominio intrínseco a tirosina cinasas, estas se pueden unir a cinasas citoplasmáticas, principalmente la JAK2 (Ghilardi y Skoda 1997). Las regiones *Box1* y *Box2* son conocidas por reclutar y unirse a las JAKs (Murakami y cols. 1991). Sin embargo, para la señalización de leptina, se ha reportado que solo *box1* y los aminoácidos circundantes son esenciales para la activación de la JAK (Bahrenberg y cols. 2002, Kloek y cols. 2002).

Además, se ha demostrado que *box1* y los aminoácidos 31-36 del dominio intracelular, son indispensables para esta interacción, mientras que los aa 37-48 están involucrados en la potenciación de la señalización (Kloek y cols. 2002). Cabe destacar que los dominios intracelulares de las isoformas del Ob-R contienen en su región yuxtamembranal al dominio

de unión a la JAK, es decir el *box1*, mientras la Ob-Rb también incluye la región *box2* y los sitios de unión a la STAT.

Por otro lado, debido a que la Ob-Rb no tiene actividad enzimática intrínseca, esta se produce con la activación no covalente producida por su autofosforilación en numerosos residuos de tirosina por la JAK2, o por su fosforilación en residuos de tirosina en el sitio de unión al ligando. Por lo tanto, estos dominios intracelulares fosforilados, proveen un sitio de unión para las proteínas STAT (STAT3, STAT5 y STAT6) las cuales son activadas y translocadas al núcleo donde estimulan la transcripción (Sweeney 2002).

Abundantes datos han mostrado que la vía de señalización JAK/STAT se encuentra regulada bajo control negativo por las proteínas intracelulares denominadas señales supresoras de citocinas (SOCS3; Sahu 2004, Muller y cols. 2005), las cuales son activadas por la propia leptina (Eyckerman y cols. 2000, Sahu 2004). Por lo que la expresión endógena de SOCS3 inhibe la fosforilación de tirosina de la Ob-Rb, siendo un importante mecanismo de retroalimentación de la señalización del receptor a nivel transcripcional (Bjorbaek y Kahn 2004). Sin embargo, se han relacionado los cambios en la expresión de SOCS3 con el fenómeno de resistencia a la leptina cuando existe hiperleptinemia (Munzberg y Myers 2005), el cual se debe a un mecanismo de retroalimentación negativa (Banks y cols. 2000). Además, cuando existen deficiencias de la SOCS3 también pudiera haber una elevación en la sensibilidad a leptina en donde se provocara obesidad inducida por la dieta (Howard y cols. 2004, Mori y cols. 2004).

2.8.4. Acciones fisiológicas de la leptina

La leptina regula diferentes funciones corporales, por ejemplo, interviene en la maduración del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (Bornstein y cols. 1997, Heiman y cols. 1997), ya que participa en el re-establecimiento de la pubertad y la fertilidad en ratones carentes del gen productor de leptina (*ob/ob*). Además, acelera la pubertad en ratones normales y facilita la CE en ratones (Wade y cols. 1997) y ratas obesas (Ahima y cols. 1997, Chehab y cols. 1997).

Por otra parte, la leptina ejerce efectos agudos en el metabolismo de roedores disminuyendo los niveles de glucosa e insulina en ratones *ob/ob* antes de manifestar pérdida de peso (Ahima y cols. 1998). Otro efectos de tipo metabólico inducidos por la leptina, es que

estimula la gluconeogénesis y el metabolismo de la glucosa en roedores normales (Kamohara y cols. 1997), regula la lipólisis, y altera el fraccionamiento de los lípidos en el músculo esquelético, así como también, produce un incremento en la síntesis de los ácidos grasos en el hígado (Pelleymounter y cols. 1995, Siegrist-Kaiser y cols. 1997).

Algunos de los procesos fisiológicos regulados por leptina son: a) aumenta la actividad nerviosa simpática en el tejido adiposo, glándulas adrenales, riñón, y músculo esquelético de las extremidades posteriores (Haynes y cols. 1997); b) regula las funciones cardiovasculares y renales vía SNC (Haynes y cols. 1997); c) ejerce un papel importante en el desarrollo fetal debido a que se han encontrado sus receptores en tejidos fetales y la formación de leptina en la placenta (Hoggard y cols. 1997) y d) estimula la hematopoyesis y la angiogénesis (Bjorbaek, 2002).

El desarrollo cerebral también es afectado por leptina ya que los ratones ob/ob y los que carecen del receptor de leptina (db/db), muestran un bajo peso cerebral con defectos estructurales de las neuronas, la mielinización es anormal y con deficiencia en varias proteínas gliales y neuronales (Bereiter y Jeanrenaud 1979, Ahima y cols. 1999, Stepan y Swick 1999). En cambio la administración crónica de leptina en el ratón ob/ob, incrementa el peso cerebral y restaura el contenido de proteínas cerebrales y los niveles de algunas proteínas neuronales, como de la proteína asociada al crecimiento GAP-43, syntaxina 1 y la SNAP-25 (Ahima y cols. 1999, Stepan y Swick 1999).

2.8.5. Participación de la leptina sobre diferentes procesos reproductivos

Estudios pioneros realizados por Yu y cols. (1997), en segmentos de la pituitaria anterior de ratas macho adultas incubados con leptina, encontraron que se producía la liberación de la FSH, la LH y la prolactina de manera dosis dependiente después de 3 horas de incubación. Sin embargo, la administración de dosis bajas de leptina en el núcleo arqueado (Narc) y la eminencia media, provocó la liberación de GnRH y no así a las dosis altas (Yu 1997).

Posteriormente, se demostró que diversos factores hormonales regulan la concentración sérica de leptina, ya que en hembras con la misma grasa corporal que los machos, sus niveles de leptina son mayores, a pesar de existir una correlación entre los niveles séricos de ésta y la grasa corporal (Considine y Caro 1997, Rosenbaum y Leibel 1999). Estas diferencias se deben

al hecho de que los estrógenos aumentan la producción de leptina (Shimizu y cols. 1997), mientras que los andrógenos la suprimen (Mantzoros y cols. 1997), tan es así, que en la rata ovx se inhibe la expresión de leptina en el tejido adiposo blanco y por lo tanto disminuye los niveles séricos (Yoneda y cols. 1998, Chu y cols. 1999, Machinal y cols. 1999), mientras que la administración de E₂ revierte los efectos de la ovx.

Otros estudios han relacionado a la leptina como una hormona ligada estrechamente con el inicio de la pubertad, ya que la administración de este compuesto directamente en el ventrículo cerebral de la rata inicia este fenómeno reproductivo (Gruaz y cols. 1998). Además, en ratones prepuberales la administración de leptina puede acortar el tiempo de inicio de la pubertad (Ahima y cols. 1997, Chehab y cols. 1997). Este dato es fuertemente apoyado al utilizar ratones ob/ob que nunca han entrado a la pubertad, ya que la administración de la leptina adelanta el inicio normal de este fenómeno (Farooqi 2002). Sin embargo, la leptina puede tener un papel permisivo en el inicio de este fenómeno reproductivo, (Cheung y cols. 1997) ya que la administración de leptina en ratas con restricción alimenticia severa no es capaz de inducir el inicio de ésta.

En mujeres se han observado incrementos en los niveles de leptina en la fase folicular temprana, alcanzando un pico a la mitad de la fase lutea y regresando a niveles basales durante la menstruación (Riad-Gabriel y cols. 1998). Además, la administración de E₂ seguido de P₄ provoca un incremento en sus niveles séricos (Messinis y cols. 2000), mientras que la administración de leptina en ratones ob/ob infértiles, restaura dicho fenómeno reproductivo (Chehab y cols. 1996), y en el hámster revierte la anovulación inducida por el ayuno, aún cuando los recursos alimenticios no son una limitante (Schneider y cols. 1998).

Por otro lado, los niveles de leptina regulan el funcionamiento de los ovarios ya que se ha observado que en sujetos obesos al producir altos niveles de este péptido se reduce el funcionamiento ovárico (Imani y cols. 2000). Los mismos efectos se muestran en mujeres obesas, hiperandrogénicas y amorreicas en donde los niveles de leptina son muy elevados y provocan un fenómeno de resistencia a la leptina ya que estas mujeres permanecerán en anovulación aún después de un tratamiento con citrato de clomifeno (fármaco que provoca la ovulación; Imani y cols. 2000).

Se ha reportado que la leptina también juega un papel importante durante la gestación, ya

que existe un incremento en las concentraciones séricas de esta hormona durante esta etapa reproductiva, sobre todo se han encontrado receptores de leptina en el sincitiotrofoblasto (Hoggard y cols. 1997, Masuzaki y cols. 1997). Estos hallazgos sugieren un papel autócrino y parácrino específico de la leptina en la interface materno-fetal.

2.8.6. Efecto de la leptina sobre la inducción de la CE en roedores

Pocos son los trabajos que se han realizado con el propósito de estudiar los efectos de la leptina sobre la regulación de la CE en diferentes condiciones y especies de roedores. Así, Wade y cols. (1997), mostraron que en hembras de hámsters tratadas con leptina y en condiciones de ayuno se potenciaba la inhibición de la CE. Por el contrario en los animales alimentados *ad libitum*, la leptina facilitaba la CE. Por lo que con estos resultados podemos concluir que la leptina facilita la CE solo en esas condiciones en donde los animales se mantienen con un balance energético adecuado.

En otro estudio Fox y Olster (2000) investigaron los efectos de la administración icv de leptina en el modelo de las ratas obesas Zucker (fa/fa), en donde la leptina no tiene efectos, ya que muestran una mutación en el receptor de la leptina. Estos investigadores encontraron que la administración de leptina redujo la ingesta de alimento pero no incrementó la CE inducida por el BE y la P₄, sin embargo, se inhibieron las conductas proceptivas en estas ratas alimentadas *ad libitum* (Fox y Olster 2000).

Finalmente, Schneider y cols. (2007) estudiaron el efecto de la leptina sobre la elección por parte de las hembras a interactuar sexualmente con un macho o elegir la ingesta de alimento en hembras de hámsters Sirios en condiciones seminaturales, de ayuno y con alimento *ad libitum*. Así, las hembras con libre disposición de alimento mostraron una alta preferencia por los machos en los días 3 y 4 de su ciclo estral (días en los que ocurre la ovulación y se manifiesta la CE). Sin embargo, en las hembras que fueron sometidas a un periodo de ayuno por 48 hrs, se disminuyó significativamente la CE e incrementó la preferencia por la ingesta y el acaparamiento de alimento en el día 3 del estro. Otro grupo de animales fue sometido a ayuno y el otro alimentado *ad libitum* pero tratados con leptina o su vehículo. Los resultados mostraron que en las hembras que mostraron inicialmente una baja preferencia por el sexo debido al ayuno, la administración de leptina significativamente incrementó su deseo sexual

sin embargo, no hubo diferencias significativas entre este grupo y aquellos animales alimentados *ad-libitum* y tratados con leptina (Schneider y cols. 2007).

2.9. Mecanismos celulares involucrados en la inducción de la CE en roedores

En esta sección se describen los diferentes mecanismos que han sido propuestos para explicar la manera por la cual las progestinas y compuestos no esteroideos estimulan al SNC para disparar la expresión de la CE en roedores.

2.9.1. Mecanismo genómico

En la década de los 60s se creía que el efecto de las hormonas esteroideas era en la membrana celular, facilitando el transporte de iones al interior de la célula. Posteriormente, Jensen y cols. (1968) encontraron que el E₂ marcado radioactivamente se unía con alta afinidad y especificidad a su receptor en células del útero. Además, observaron que el complejo esteroide-receptor era capaz de unirse al ADN. Estos hallazgos les permitieron postular su clásico mecanismo de acción de esteroideos, de dos pasos (Figura 11). Este modelo consiste en que una vez que el E₂ llega a la célula, atraviesa por difusión pasiva la membrana de la célula blanco y se une a su receptor citoplásmico. La unión de la hormona con su receptor forma un complejo estable “activo” que es translocado al núcleo, en donde actúa como un factor de transcripción, uniéndose a sitios aceptores en el ADN para activar la maquinaria transcripcional y la subsecuente síntesis de proteínas específicas (Jensen y cols. 1968). Actualmente este modelo ha sido ligeramente modificado para el caso de los receptores a P₄ y estrógenos.

Numerosos trabajos apoyan la participación del mecanismo genómico propuesto por Jensen y cols. (1968), para la activación de la CE en roedores, ya que: 1) se ha observado que el E₂ provoca la síntesis del RP (O'Malley y cols. 1991); 2) existe una latencia considerable (varios minutos), entre la administración sistémica de P₄ y la inducción de la CE (Whalen y Gorzalka 1972, Glaser y cols. 1983, Pleim y DeBold 1984); 3) la acción lordogénica de la P₄ es bloqueada por inhibidores de síntesis de proteínas (Glaser y Barfield 1984, Meisel y Pfaff 1985); 4) existe una correlación positiva entre la concentración del RP en el hipotálamo y la expresión de la CE (Blaustein y Wade 1978, McGinnis y cols. 1981, Ahdieh y cols. 1986); 5)

la acción lordogénica de la P₄ es bloqueada por la antiproggestina RU486, que compite por el RP (Brown y Blaustein 1984, Etgen y Barfield 1986, González-Mariscal y cols. 1989); 6) la inhibición secuencial (efecto facilitador de la CE inducido por P₄, seguido por un periodo en el cual las hembras son refractarias a la reactivación de la lordosis por una segunda administración de P₄), coincide con una “regulación a la baja” del RP en el HVM y el APOM (Czaja y cols. 1974, Blaustein y Feder 1980, González-Mariscal y cols. 1993); 7) algunas progestinas sintéticas (como el R5020, el Norgestrel), que muestran mayor afinidad por el RP que la P₄ (Kincl 1964, Moguilewsky y Raynaud 1979), tienen una potencia lordogénica mayor que la P₄ y 8) la administración de antisentidos para el RP tanto en ratas como ratones, así como en ratones *Knockout*, evita el despliegue de la CE aún después de ser tratados con estrógenos y P₄ (Mani y Portillo 2010).

2.9.2. Mecanismo extragenómico

Este es un modelo alternativo al mecanismo genómico que se ha propuesto para la facilitación de la CE por la P₄ (Beyer 1980, Beyer y Canchola 1981, Etgen 1984, Beyer y González-Mariscal 1986), sobre todo por agentes que debido a su lipofobicidad, ejercen preferentemente su acción sobre la membrana celular y que ha sido apoyado por los siguientes eventos: 1) cortas latencias para inducir la CE en ratas ovx pretratadas con E₂ (Lisk 1960, Ross y cols. 1971, Kubli-Garfias y Whalen 1977), es decir, la CE ha sido observada dentro de los primeros 5 o 10 minutos después de la inyección iv de P₄ (200 a 400 µg), o de algunos metabolitos de la P₄, como la 20α-OHP, o la 5α-pregnan-20α-ol-3-ona (Czaja y cols. 1974, Kubli-Garfias y Whalen 1977). Latencias similares (alrededor de 15 minutos) fueron encontradas después de la administración intracerebral de P₄ en ratas ovx y estrogenizadas, (Powers 1972); 2) agentes no esteroideos que no atraviesan la membrana celular (GnRH, péptidos, proteínas, aminos biogénicos, acetilcolina, prostaglandinas, aminoácidos y segundos mensajeros), son capaces de inducir intensa CE en ratas ovx-pretratadas con E₂. Esta idea es apoyada por el hecho de que la PGE₂ y la GnRH al ser administradas en tercer ventrículo facilitan la CE a las 2 horas después de la inyección de estos agentes y por la capacidad del RU486 para interferir con el efecto facilitador de la PGE₂ y la GnRH (Beyer y cols. 2003, Mani y Portillo 2010); 3) la aplicación de segundos mensajeros, como el AMPc o el GMPc son capaces de disparar la

expresión de la CE. En estudios iniciales realizados en nuestro laboratorio, se exploró el efecto del AMPc y el GMPc sobre la expresión de la CE de la rata pretratada con estrógenos (Beyer y cols. 1981, Fernández-Guasti y cols. 1983, Beyer y González-Mariscal 1986). Se encontró que el dibutilil AMPc, tanto infundido en el APOm (50 µg) como inyectado sistémicamente, facilitaba la lordosis, al menos en el 50% de las hembras.

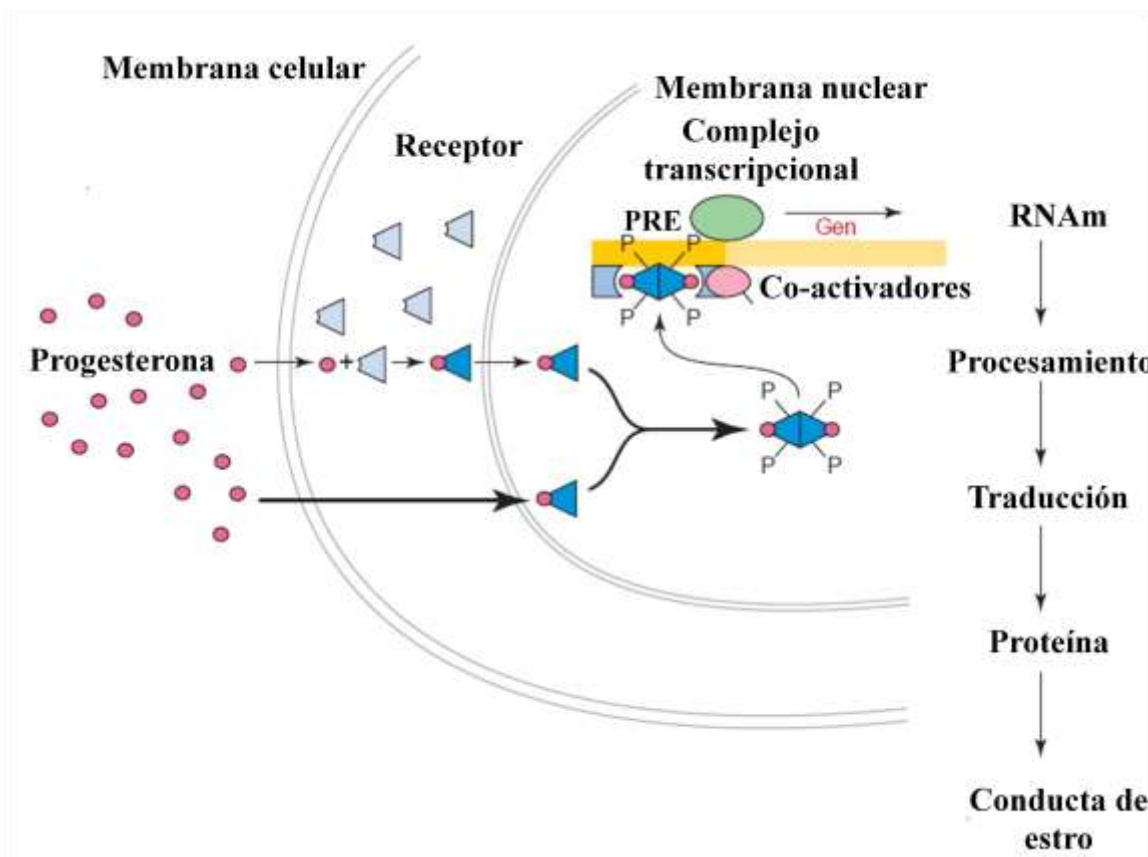


Figura 11. Mecanismo clásico de activación del RP por medio de la P₄. La P₄ atraviesa la membrana celular y se une a su receptor ubicado en el citoplasma o en el núcleo. Una vez que los receptores se unen a su ligando, son translocados al núcleo, donde actúa como un factor de transcripción. Este dímero se une a elementos de respuesta a la hormona en el ADN e interactúa con proteínas correguladoras de los receptores nucleares para llevar a cabo la transcripción. PRE = elementos de respuesta a progestinas; P = sitios fosforilados. Modificado de Auger y cols. (2001).

Además, la teofilina (un bloqueador de fosfodiesterasas), administrada simultáneamente con el AMPc, incrementó y prolongó la acción facilitadora del nucleótido en hembras tratadas

con 2 µg de BE (Beyer y Canchola 1981); 4) el uso de la P₄ conjugada con suero de albumina, el cual impide que la P₄ penetre en la célula, provoca clara CE en ratas y en hámsters ovx. La administración de esta combinación farmacológica directamente en el APOm induce significativa CE a los 5 minutos en ratas y hámsters ovx pretratadas con E₂ (Frye y cols. 1996).

2.9.3. Modelo de la comunicación cruzada entre los mecanismos genómico y extragenómico para la estimulación de la CE

En la década de los 80s, se propuso que la acción facilitadora de la P₄, así como de otros compuestos lorigénicos, por ejemplo la GnRH, sobre la CE en roedores era mediada por la fosforilación de proteínas (Beyer y Canchola 1981, Beyer y cols. 1982, Beyer y González-Mariscal 1986). Este modelo se presenta con detalle en la Figura 12. Como se muestra en este diagrama, los estrógenos inicialmente atraviesan por difusión pasiva la membrana celular de la neurona blanco y se une a un receptor intracelular en el citoplasma, formando un complejo hormona-receptor activo. Este compuesto es translocado al núcleo, donde actúa como un factor de transcripción al unirse a sitios aceptores del ADN y estimula la síntesis de ARNm. A partir del ARNm recién generado se sintetizan proteínas, las cuales se encuentran en estado inactivo. La activación de estas proteínas inactivas inducidas por estrógeno (PIEi), se lleva a cabo al ser fosforiladas por proteínas cinasas dependientes de AMPc, o algunas otras reguladas por otros segundos mensajeros. El AMPc puede ser producido por la interacción de diversos agentes que actúan sobre receptores de membrana acoplados al sistema de adenilato ciclasa (como la P₄, GnRH, PGE₂ o NA). El efecto final de esta fosforilación da como resultado la inducción de la CE. Esto explicaría la capacidad de numerosos agentes lorigénicos como la GnRH, PGE₂ o la NA, para estimular la CE sin unirse directamente al RP.

Por otra parte, es posible que la P₄ también provoque la fosforilación de las PIEi. Al actuar directamente sobre ellas (unión directa) o de manera indirecta al incrementar los niveles de NA en terminales vecinas al HVM y que, a su vez, este compuesto active a sus receptores membranales que se encuentran acoplados al sistema de la adenilato ciclasa. Cabe resaltar que nuestro grupo propuso que las PIEi pudieran ser los RPs (Beyer 1980, Beyer y González-Mariscal 1986), mismos que se sabe son inducidos por estrógenos (Moguilewsky y Raynaud

1977, McGinnis y cols. 1981), además de ser fosfoproteínas (Denner y cols. 1990, O'Malley y cols. 1991, Poletti y cols. 1993).

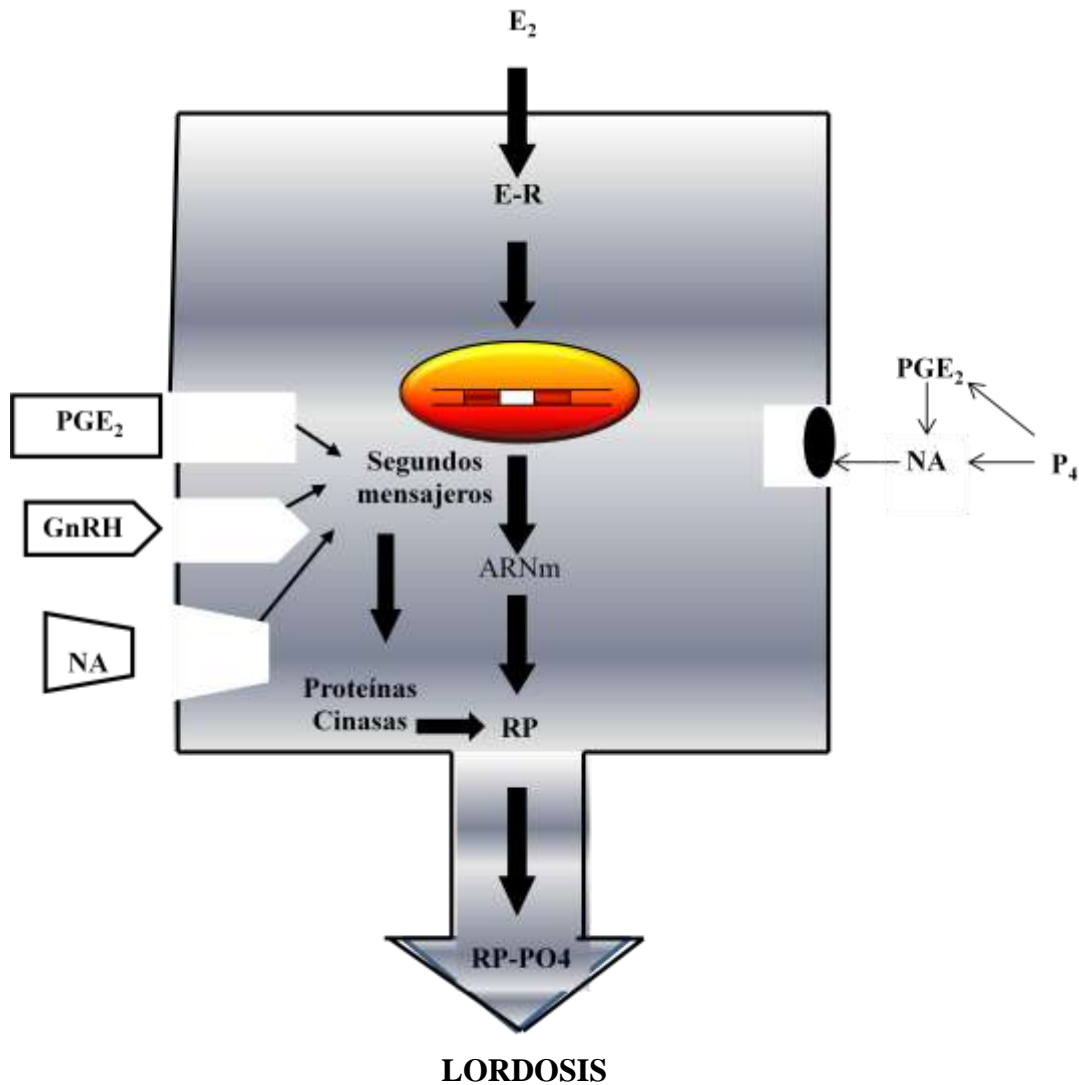


Figura 12. Modelo Propuesto por Bayer y colaboradores para explicar la activación de la conducta de lordosis inducida por agentes que actúan sobre la membrana celular. La Figura muestra la activación de cascadas de segundos mensajeros para la activación del receptor a progesterona intracelular (Bayer y cols., 1981). P₄ = progesterona; PGE₂ = prostaglandina E₂; GnRH = hormona liberadora de gonadotropinas; NA = noradrenalina; AMPc = adenosina monofosfato cíclico; E= estrógenos, E-R= complejo estrógenos-receptor a estrógenos; ARNm= ácido desoxirribonucleico mensajero; RP= receptor a progesterona; RP-PO₄= receptor a progesterona fosforilado.

Este fue el primer modelo in vivo propuesto para explicar la importancia de una comunicación cruzada entre el mecanismo genómico y el membranal en donde el AMPc y una variedad de agentes que actúan sobre sus receptores membranales pueden sustituir el efecto lordogénico de la P₄ en hembras de roedores ovx y estrogenizadas.

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, la mayoría de los experimentos diseñados para explorar el papel de la leptina sobre la CE han utilizado modelos de ratas y ratones privados de alimento o sometidos a ayuno, mutantes del gen productor de leptina o el de su receptor (Schneider y cols 2007, Fox y Olster 2000, Wade y cols 1997). Sin embargo, no se sabe si la leptina es capaz de inducir la conducta de estro (lordosis y proceptividad) en un modelo de ratas ovx pretratadas con estrógenos y alimentadas *ad libitum*. Por otro lado, el mecanismo celular por el cual la leptina induce CE, no ha sido bien estudiado. Se conoce que la leptina tiene la capacidad de liberar a la GnRH, un péptido capaz de facilitar la CE en la rata, por lo que cabría la posibilidad que este fuera uno de los mecanismos por los cuales la leptina facilitaría dicha conducta. Además, se conoce que la CE inducida por la GnRH puede ser mediada a través de la activación del RP, ya que la administración de la antiprogestina RU486, bloquea la CE inducida por ese péptido (Beyer y cols. 1997), por lo que favorece la idea de que en la CE inducida por leptina también podría estar participando el RP.

4. HIPÓTESIS

La leptina induce la conducta de lordosis en hembras alimentadas *ad libitum* y esta puede ser mediada a través de los receptores a GnRH-1 y a progesterona en ratas ovariectomizadas, pretratadas con estradiol.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar si la leptina es capaz de inducir la expresión de la conducta de lordosis y la proceptividad en ratas ovx-pretratadas con benzoato de estradiol y alimentadas *ad libitum*, y de ser así, determinar si en esta conducta participan los receptores a GnRH-1 y a progesterona.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar curvas dosis respuesta de la leptina administrada en el ventrículo lateral derecho, para establecer la concentración capaz de inducir conducta de lordosis y proceptividad en ratas pretratadas con 5 µg de benzoato de estradiol.
- b) Explorar la participación del receptor a GnRH-1, a través de la administración icv de su antagonista (antide), sobre la conducta de lordosis inducida por 1 y 3 µg de leptina.
- c) Determinar la participación del receptor a progesterona sobre la conducta de lordosis inducida por 1 y 3 µg de leptina, mediante la administración de la antiprogestina RU486.

6. METODOLOGÍA

6.1. Metodología general

6.1.1. Animales

81 ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley, criadas en el bioterio del Centro de Investigación en Reproducción Animal del laboratorio ubicado en Panotla-Tlaxcala, fueron utilizadas en esta tesis. Al inicio de los experimentos, las hembras pesaron entre 230 y 270 g y fueron mantenidas bajo condiciones controladas de temperatura (23 ± 2 °C) y con ciclo de luz oscuridad invertido (14 h de iluminación por 10 h de oscuridad). Las hembras fueron alimentadas con alimento balanceado para rata (nutricubos Purina) y agua *ad libitum*.

6.1.2. Procedimientos quirúrgicos

Ovariectomía

Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de xilazina (4 mg/kg) y ketamina (80 mg/kg) y rasuradas en el abdomen, desde el xifoideas hasta el pubis. Posteriormente, se desinfectó dicha región con cloruro de benzalconio al 25% y se realizó una incisión de 1 cm de longitud en el tercio medio del abdomen caudal a la altura de la línea media. Enseguida se identificó el cuerno uterino derecho y con un pequeño tirón se extrajo el ovario derecho; inmediatamente este último fue ligado con sutura de seda del No. 2 y posteriormente se cortó con una tijera Mayo. El mismo procedimiento fue seguido para la extracción del ovario izquierdo; los cuernos uterinos fueron recolocados en el abdomen. Finalmente, la capa muscular fue suturada con un punto en “U” mediante el uso de sutura de algodón del No. 2 y la piel con un punto en “U” con hilo de seda del No. 2.

Implante de cánula en el ventrículo lateral derecho

Las ratas ovx fueron anestesiadas con una mezcla de xilazina (4 mg/kg) y ketamina (80 mg/kg) y colocadas en un instrumento estereotáxico Kopf (Tujunga, CA, USA) con el propósito de implantarles una cánula de acero inoxidable (calibre 22 por 17 mm de longitud) en el ventrículo lateral derecho del cerebro, por medio de las coordenadas del atlas de Paxinos

y Watson (2006; antero-posterior + 0.80 mm, mediolateral 1.5 mm, dorsoventral -3.5 mm respecto a bregma). Posteriormente, se colocó un tornillo de acero inoxidable en el cráneo para fijar la cánula con cemento dental, así como un tapón de acero inoxidable dentro de la cánula con el propósito de evitar alguna obstrucción o contaminación. Finalmente, se les suturó la piel con puntos separados mediante el uso de un hilo de seda del No. 2. Inmediatamente después las hembras fueron inyectadas con penicilina a una dosis de 22000 UI/kg.

Todos los procedimientos usados en estos experimentos siguieron los procedimientos de la Reglamentación de la Ley General de Salud Relacionados con la Investigación en Salud (Leyes y Códigos de México 1995), y fueron aprobados por el comité institucional para el uso y cuidado de los animales de laboratorio del CINVESTAV.

6.1.3. Drogas

Los compuestos utilizados en esta tesis se enlistan en la Tabla 3. La leptina, el BE, la antiprogestina RU486 y el antagonista del receptor GnRH-1 (antide) fueron obtenidos de Sigma (St. Louis MO, EUA).

6.1.4. Evaluación de la CE

Las pruebas de CE (proceptividad y receptividad) y rechazo se realizaron en una arena circular de Plexiglás (60 cm de diámetro), en donde previamente se había colocado a un macho sexualmente experto. La prueba duró hasta que la hembra fue montada diez veces por el macho. La receptividad se evaluó a través del cociente de lordosis [(número de lordosis / 10 montas) (100)] y la intensidad de lordosis. Esta última fue cuantificada de acuerdo al puntaje de lordosis propuesto por Hardy y De Bold (1972). El rango de intensidad va de 0 a 3 para cada respuesta individual y consecuentemente de 0 a 30 para cada hembra que recibió diez montas por el macho. La fórmula matemática para la determinación de la intensidad de la lordosis fue [(grado de dorsiflexión / 10 montas) (10)]. La proceptividad se evaluó registrando la incidencia de brincoteo, carreras cortas y orejeo mostrado por las hembras. Así, la proporción de sujetos que mostraron al menos dos de esos patrones conductuales fue asignada como hembra proceptiva. Por otro lado, el rechazo fue medido registrando la incidencia de los

5 patrones motores asociados a este comportamiento como: boxeo, patada, chillido, huida y vuelta. Una hembra se considero con rechazo si presentó al menos dos de las conductas antes mencionadas durante cada sesión experimental.

Tabla 3. *Nomenclatura y Abreviaturas de las drogas utilizadas.*

Nombre químico	Nombre común	Abreviatura
1,3,5 (10)-estradien-3, 17 β -diol 3 benzoato	Benzoato de estradiol	BE
MHWGTLGFLWLWPYLFYVQAVPIQ KVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVS SKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTL AVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRD LLHVLAFSKSCHLPWASGLETLDLGLG GVLEASGYSTEVALSRLQGSLQDM LWQLDLSPGC	Leptina	Leptina
2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol	TRIS	TRIS
17 β -hidroxi-11 β -(4-dimetil-aminofenil)- 17 α -(prop-1-inil)	RU38486	RU486
Acetil-d-Ala(2-naphtil)-d-Lys(N- nicotinoil)-d-Lis (N-nicotinoil)-Leu- Lis(N-isopropil)-Pro-d-Ala-NH ₂	Antide	Antide

6.2. Metodología experimento 1

Evaluación de la curva dosis-respuesta de la leptina sobre la CE en ratas ovx-pretratadas con BE y alimentadas ad libitum

a. Tratamiento hormonal

Cuarenta y dos hembras recibieron una inyección subcutánea (sc) de 5 μ g de BE en 0.1 ml (disuelto en aceite de cártamo a una concentración de 50 μ g/ml), 40 horas antes de la administración de las diferentes dosis de leptina o su vehículo (TRIS 10 mM, pH = 8) (2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol). En este experimento la leptina fue inyectada por vía icv a las dosis que se muestran en la Tabla 4. El rango de dosis de la leptina fue obtenido del

trabajo publicado por Fox y cols. (2000), en ratas obesas Zucker tratadas con E₂ y P₄.

Tabla 4. *Dosis de leptina.*

Grupo	Tratamiento	Dosis	Número de ratas
1	TRIS	1 µl	9
2	Leptina	0.33 µg	8
3	Leptina	1 µg	8
4	Leptina	3 µg	9
5	Leptina	9 µg	8

b. Prueba conductual

La cuantificación de la receptividad y proceptividad se llevó a cabo de acuerdo a los criterios descritos en la metodología general.

c. Análisis estadístico

Debido a nuestro diseño experimental se utilizó una prueba inicial de análisis de varianza (ANOVA) para datos no paramétricos de una vía (Kruskal Wallis), con el propósito de conocer si existían diferencias entre los tratamientos a todos los tiempos probados. Posteriormente, se realizó una prueba *post hoc* para comparar la respuesta de los grupos que recibieron diferentes tratamientos. Debido a que la respuesta del cociente de lordosis en el mismo grupo no muestra una distribución normal, se empleó la prueba de U-Mann-Whitney, para comparar dos grupos independientes. Esta prueba es una excelente alternativa de la prueba t de Student con un poder de eficiencia del 95.5 % de la prueba paramétrica (Siegel y Castellan 1995). Para analizar la proporción de sujetos que mostraron proceptividad y rechazo, se utilizó, bajo el mismo esquema de comparación, la prueba de probabilidad exacta de Fisher (Siegel y Castellan 1995).

6.3. Metodología experimento 2

Evaluación de la participación del receptor GnRH-1 mediante la administración de su antagonista, el antide, sobre la CE inducida por leptina

a. Tratamiento hormonal

La Tabla 5 muestra los tratamientos que recibieron diecinueve ratas hembras inyectadas por vía icv con 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de antide, treinta y nueve horas después de la administración sc de 5 μg de BE. Una hora después las hembras recibieron una inyección icv de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (9 animales) o 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (10 animales) de leptina. Los resultados de este experimento se compararon contra los datos de la CE inducida por 1 y 3 μg de leptina del experimento 1. La dosis de antide fue seleccionada de acuerdo al estudio de Kauffman y Rissman (2004), donde el antide bloqueó el efecto conductual inducido por la GnRH.

Tabla 5. *Tratamientos para explorar la participación del receptor GnRH-1 sobre la CE inducida por leptina.*

Grupo	Tratamiento	Dosis	Número de ratas
1	Leptina + antide	1 μg + 1 μg	9
2	Leptina + antide	3 μg + 1 μg	10

b. Prueba conductual

La cuantificación de la receptividad y proceptividad se llevó a cabo de acuerdo a los criterios descritos en la metodología general.

c. Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar los grupos tratados contra el control. Esta prueba es una excelente alternativa de la prueba t de Student con un poder de eficiencia del 95.5 % de la prueba paramétrica (Siegel y Castellan 1995). Para analizar la proporción de sujetos que mostraron proceptividad y rechazo, se utilizó, bajo el mismo esquema de comparación, la prueba de probabilidad exacta de Fisher (Siegel y Castellan 1995).

6.4. Metodología experimento 3

Evaluación de la participación del RP sobre la CE inducida por leptina por medio de la administración de la antiprogestina RU486

a. Tratamiento hormonal

La Tabla 6 muestra los tratamientos realizados a diecinueve ratas hembras inyectadas con 5 µg de BE por vía subcutánea. 39 horas después del tratamiento con BE, las hembras recibieron una inyección de 5 mg de la antiprogestina RU486 por vía subcutánea. Una hora después a 9 ratas se les administro, por vía icv, una dosis de 1 µg/µl de leptina y a otro grupo de 10 ratas se les inyectó 3 µg/µl de leptina por la misma vía. Los resultados con el RU486 fueron comparados contra los datos de la conducta de lordosis inducida por 1 y 3 µg/µl de leptina del experimento 1. La dosis de RU486 fue tomada de estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Beyer y cols. 1997).

Tabla 6. *Tratamientos para explorar la participación del receptor a progesterona sobre la CE inducida por leptina.*

Grupo	Tratamiento	Dosis	Número de ratas
1	RU486 + Leptina	5 mg + 1 µg	9
2	RU486 + Leptina	5 mg + 3 µg	10

b. Prueba conductual

La cuantificación de la receptividad se llevó a cabo de acuerdo a los criterios descritos en la metodología general.

c. Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar el efecto lordogénico de los grupos tratados con RU486 contra aquellos grupos tratados únicamente con leptina. Esta prueba es una excelente alternativa de la prueba t de Student con un poder de eficiencia del 95.5 % de la prueba paramétrica (Siegel y Castellan 1995). Para analizar la proporción de sujetos que mostraron proceptividad y rechazo, se utilizó, bajo el mismo esquema de comparación, la prueba de probabilidad exacta de Fisher (Siegel y Castellan 1995).

7. RESULTADOS

Experimento 1.

La Figura 13 muestra la curva dosis-respuesta para la CL inducida por la infusión icv de varias dosis de leptina en ratas pretratadas con BE a los 60, 120 y 240 minutos. El grupo control que sólo recibió una inyección de BE y el vehículo de la leptina, mostró muy bajos niveles de lordosis a los tres intervalos de tiempo estudiados, sin mostrar conductas proceptivas. Las hembras que recibieron la combinación de BE y leptina, expresaron CL a los tres intervalos de tiempo probados a las diferentes dosis utilizadas (de 1 a 9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Aunque los niveles de respuesta no fueron lineales ya que la dosis más alta de 9 μg produjo respuestas similares a la dosis de 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, si existió una porción lineal en la respuesta con las 3 primeras dosis utilizadas (0.3, 1 y 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a los 60 y 120 minutos.

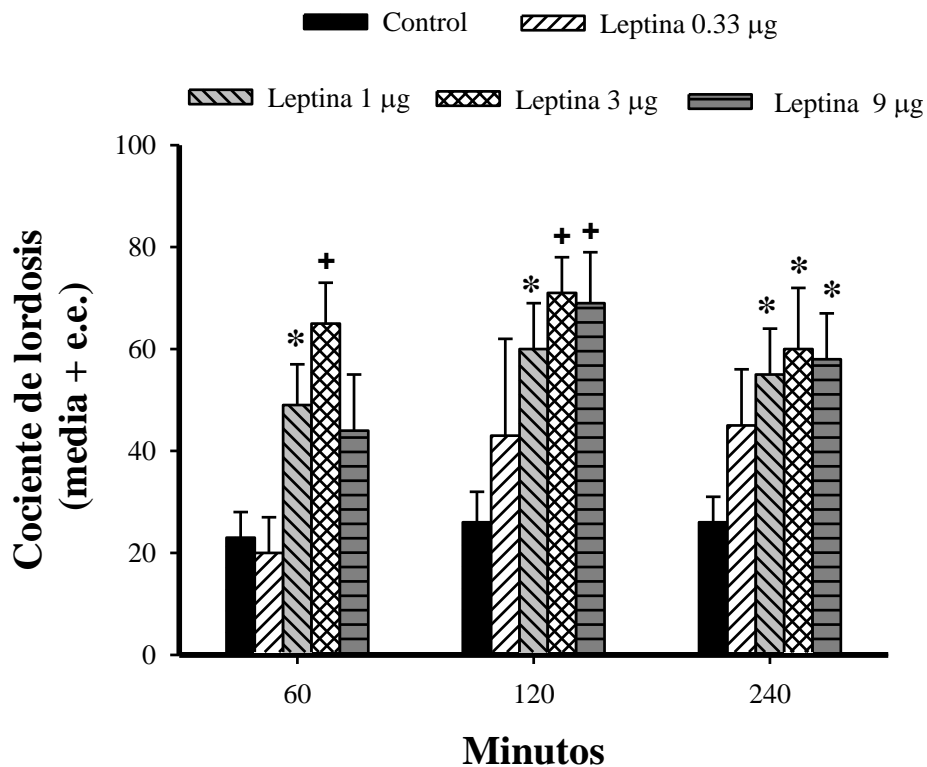


Figura 13. Efecto de la inyección icv de 0.33 ($n = 8$), 1 ($n = 8$), 3 ($n = 8$) y 9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($n = 9$) de leptina en ratas hembras ovx y pretratadas con BE en el cociente de lordosis. Las hembras fueron probadas a los 60, 120 y 240 minutos después de recibir la administración icv de leptina o el vehículo (control). * $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

En la Figura 13 se observa un incremento significativo en el cociente de lordosis a los 60 [$P \leq 0.04$ ($U = 15$)] y a los 240 minutos [$P \leq 0.04$ ($U = 15$)] después de la inyección icv de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de leptina ($P < 0.05$). La dosis de 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de leptina también indujo clara conducta de lordosis a los 60 [$P \leq 0.01$ ($U = 10$)] y 120 [$P \leq 0.04$ ($U = 6.5$)] minutos después de su administración icv, comparada con el grupo control tratado con el vehículo de la leptina.

La intensidad de lordosis inducida por leptina (Figura 14) fue muy baja con las dos primeras dosis probadas, estableciendo un ligero incremento con las dosis de 3 [$P \leq 0.04$ ($U = 6.5$)] y 9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ [$P < 0.02$ ($U = 12$)] sobre todo a los 60 minutos.

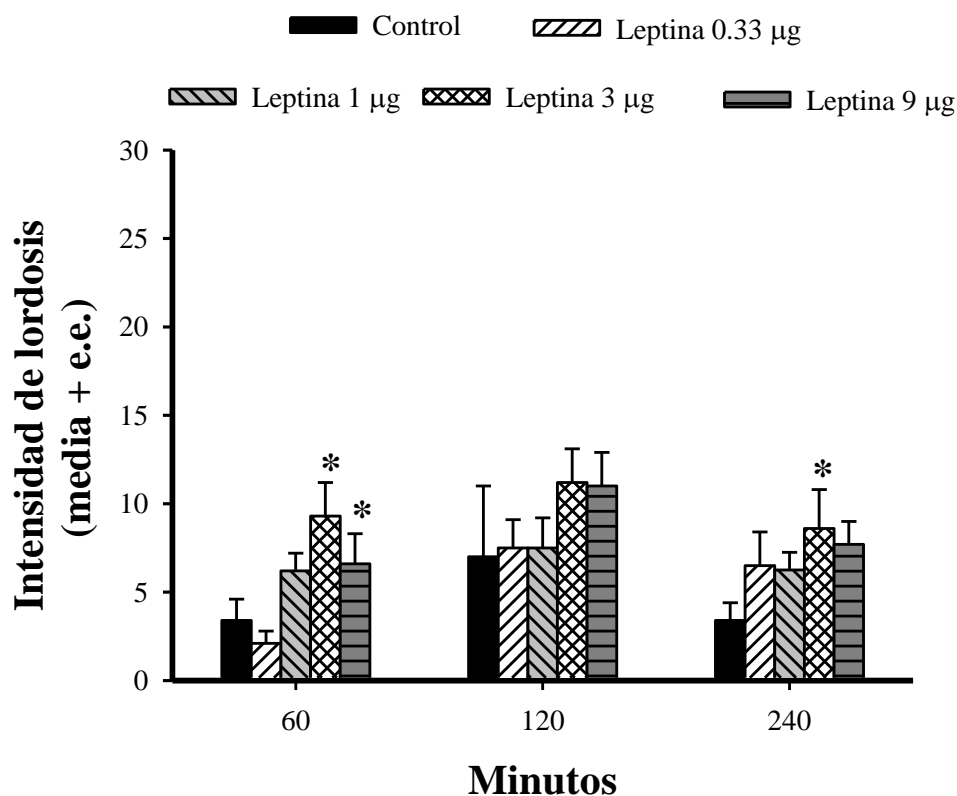


Figura 14. Intensidad de la lordosis inducida por la inyección icv de 0.33 ($n = 8$), 1 ($n = 8$), 3 ($n = 8$) y 9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($n = 9$) de leptina en ratas hembras ovx y pretratadas con BE. Las hembras fueron probadas a los 60, 120 y 240 minutos después de recibir la administración icv de leptina o su vehículo (control). ⁺ $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

La Figura 15 muestra el porcentaje de hembras que mostraron conductas proceptivas a los

3 intervalos de tiempo probados después de la administración de las diferentes dosis de leptina. Se observa que la leptina solo indujo ligera proceptividad, ya que solo un 20% de las hembras mostraron algunas de las tres conductas proceptivas evaluadas sobre todo a los 60 y 120 minutos.

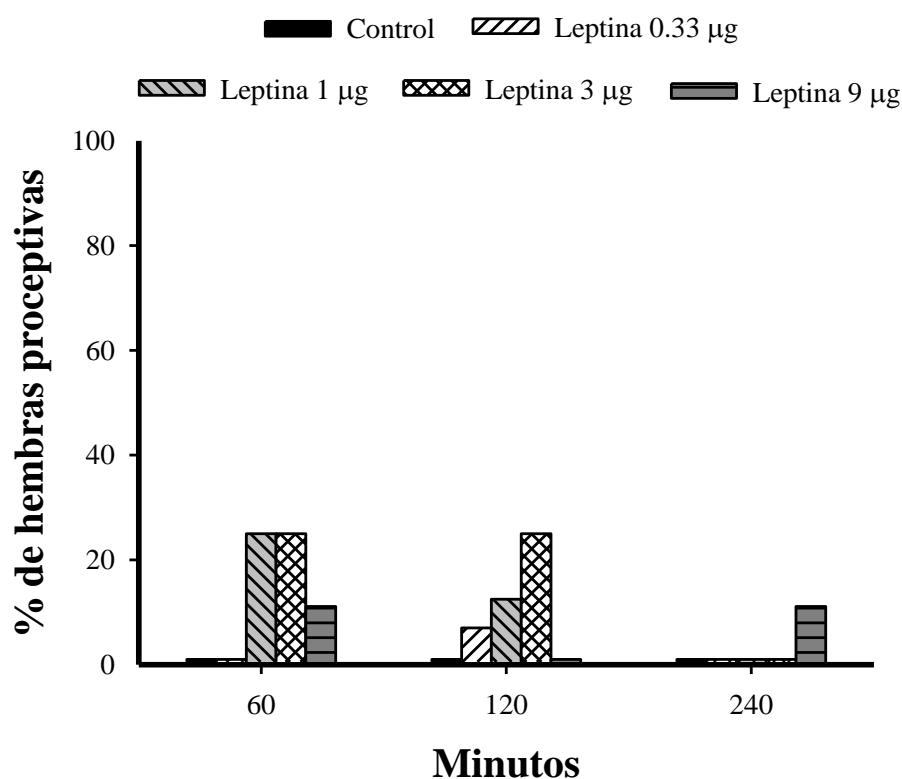


Figura 15. Efecto de la inyección icv de 0.33 ($n = 8$), 1 ($n = 8$), 3 ($n = 8$) y 9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($n = 9$), de leptina en ratas hembras ovx y pretratadas con BE en el porcentaje de hembras proceptivas. Las hembras fueron probadas a los 60, 120 y 240 minutos después de recibir la administración icv de leptina o su vehículo (control). $^*P < 0.01$, $^*P < 0.05$.

La Figura 16 muestra el porcentaje de hembras que mostraron conductas de rechazo a los tres intervalos de tiempo estudiados, después de la administración de las diferentes dosis de leptina. Interesantemente, un alto porcentaje de hembras (85%) tratadas con la dosis de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ desplegaron al menos tres conductas de rechazo a los 60 minutos, comparado con los animales del grupo control ($P < 0.05$). Además la dosis de 9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ indujo rechazo en el 70% de las hembras a los 120 minutos ($P < 0.05$) respecto al grupo control.

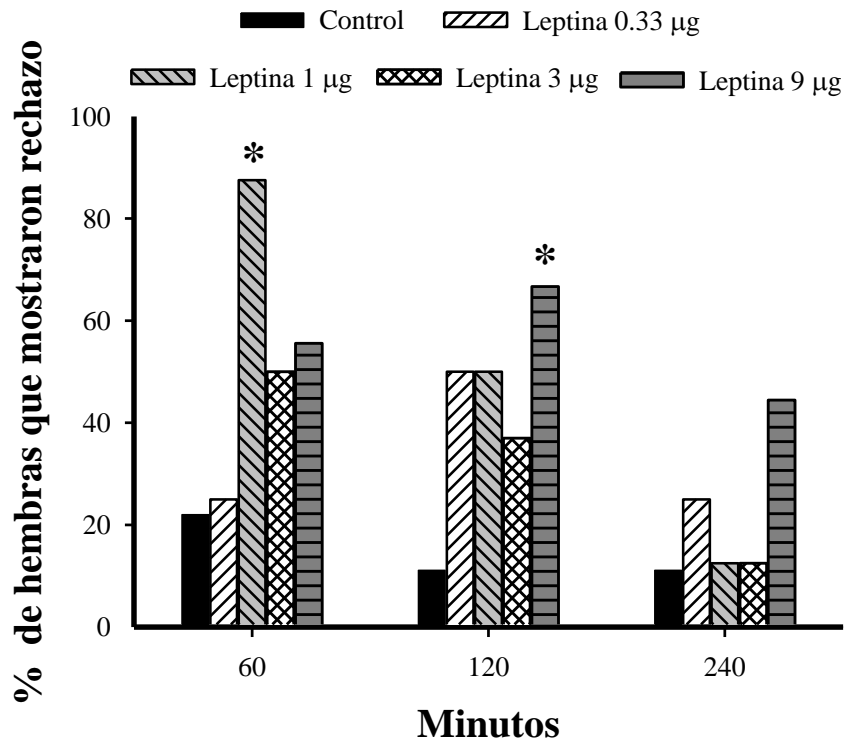


Figura 16. Porcentaje de hembras que muestran al menos tres conductas de rechazo con el tratamiento de 0.33 ($n = 8$), 1 ($n = 8$), 3 ($n = 8$) y 9 μg ($n = 9$), de leptina en ratas hembras ovx y pretratadas con BE. Las hembras fueron probadas a los 60, 120 y 240 minutos después de recibir la administración icv de leptina o su vehículo (control). * $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

Experimento 2.

La Figura 17 muestra que la administración icv de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de antide bloqueó significativamente la CL inducida tanto por 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (A) a los 60 [$P < 0.01$ ($U = 9$)] y 120 [$P < 0.01$ ($U = 5$)] minutos como por 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (B) de leptina en ratas ovx pretratadas con BE a los 60 [$P < 0.01$ ($U = 3$)], 120 [$P < 0.01$ ($U = 4.5$)] y 240 [$P < 0.05$ ($U = 17.5$)] minutos. Además, el antide reduce significativamente la expresión de las conductas de rechazo, ya que sólo una hembra tratada con antide mostró esta conducta.

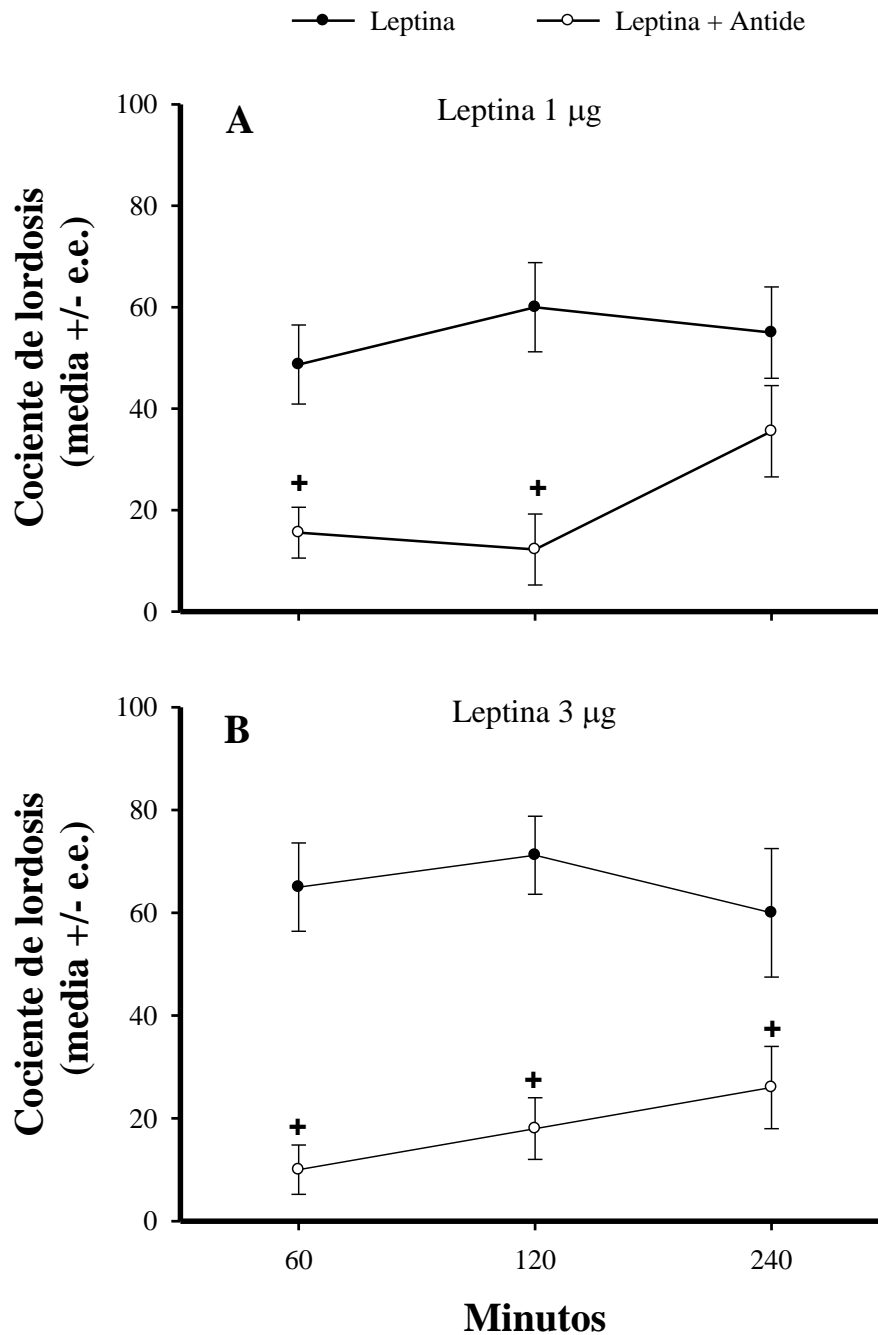


Figura 17. Efecto de la inyección icv de 1 μg de antide sobre la CL inducida por 1 (A; $n = 9$) ó 3 μg de leptina (B; $n = 10$). La CL inducida por 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de leptina a los 60, 120 minutos fue inhibida por la inyección previa de antide. En cambio, la CL inducida por 3 μg de leptina a los 60, 120 y 240 minutos fue inhibida por la inyección previa del antide. El antide o su vehículo fueron inyectados 60 minutos antes de la administración de la leptina. ⁺ $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

Experimento 3.

La Figura 18 muestra la CL inducida por la administración icv de 1 (A) y 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (B) de leptina. La administración de RU486 disminuyó significativamente la CL inducida por 1 y 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de leptina a los 60 y 120 minutos, es decir, con 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a los 60 minutos [P <0.01 (U = 11)] y a los 120 minutos [P <0.01 (U = 11)] y con 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a los 60 [P <0.001 (U = 8)] y a los 120 [P <0.001 (U = 10)] minutos. El efecto de la antiprogestina fue transitorio ya que a los 240 minutos después de la administración de leptina, no se observaron diferencias significativas entre las hembras tratadas con leptina y aquellas inyectadas con la combinación de leptina y el RU486. Además, el RU486 también disminuye significativamente tanto la CL como el porcentaje de hembras que mostraron conductas de rechazo.

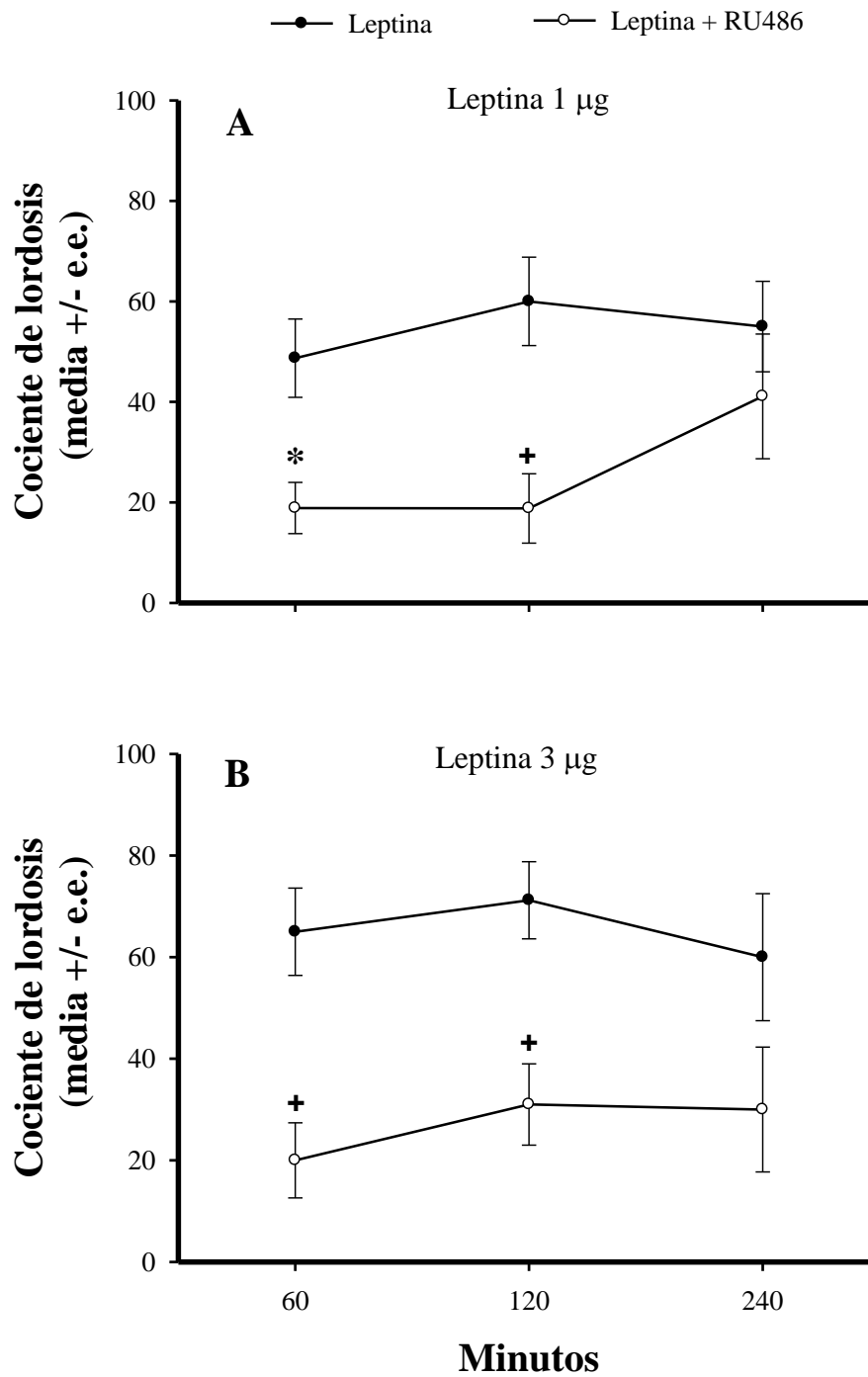


Figura 17. Efecto de la inyección sc de 5 mg de RU486 sobre la CL inducida por 1 (A; n = 9) ó 3 µg de leptina (B; n = 10). La CL inducida por 1 ó 3 µg/µl de leptina a los 60 y 120 minutos fue inhibida por el RU486. El RU486 o su vehículo fueron inyectados 60 minutos antes de la administración de la leptina. †P <0.01, *P <0.05.

8. DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis muestran que la administración icv de leptina induce clara CL en nuestro modelo de la rata ovx-pretratada con BE y alimentada *ad libitum*. Una interesante característica de la curva dosis respuesta de la leptina fue que la dosis mayor empleada, 9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, no fue la que produjo la mejor respuesta de lordosis sino, como se puede apreciar en los resultados del experimento 1, las dosis de 1 y 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ fueron más efectivas que la dosis de 0.33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y similares a las obtenidas con 9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. El hecho de que la leptina haya inducido dicha conducta concuerda con los resultados obtenidos por Wade y cols. (1997), y es importante enfatizar que estos investigadores realizaron sus experimentos en hámsters alimentados *ad-libitum* y pretratados con BE y P_4 , encontrando que el tratamiento con leptina potenció la lordosis inducida por ese tratamiento hormonal, sin embargo, en roedores sometidos a un ayuno previo no fue así.

Sin embargo, la leptina no induce un despliegue completo de la CE, ya que la proceptividad manifestada por las hembras tratadas con leptina no fue estadísticamente diferente con respecto a las hembras del grupo control. Este resultado concuerda con los datos obtenidos previamente por Fox y cols. (2000), los cuales reportaron que la administración de leptina por vía icv inhibe la proceptividad en ratas obesas Zucker y en ratas normales tratadas con BE y P_4 . Es importante señalar que las ratas obesas Zucker son animales que contienen una mutación del gen del receptor de la leptina, por lo que no manifiestan CE a pesar de recibir un adecuado tratamiento hormonal.

Este resultado, paradójico, en donde por un lado la leptina facilita la lordosis y por el otro inhibe la proceptividad, sugiere que la hormona puede, de manera directa o indirecta, disociar mecanismos nerviosos que bajo situaciones normales funcionan en conjunto y que son regularmente los activados por la P_4 . Por otro lado, el mecanismo celular involucrado en la activación de las conductas proceptivas por esteroides o agentes no esteroidales no ha sido bien estudiado. Es claro que los sistemas nerviosos que median la expresión de la lordosis son diferentes de esos involucrados en los aspectos motivacionales de la CE. Así, los efectos que ejerce la leptina en algunas áreas del cerebro no son suficientes para reclutar todos los aspectos que involucran el despliegue de la CE. Una posible alternativa para explicar el

porqué la leptina no es capaz de activar las conductas proceptivas, pudiera deberse a sus efectos moduladores en diferentes sistemas de neurotransmisores. Por ejemplo, estudios *in vitro* muestran que la leptina disminuye la liberación de noradrenalina (NA) en el hipotálamo de manera dosis dependiente (Francis y cols. 2004), lo que provoca que se incrementen significativamente las conductas de rechazo (Meston y cols. 1996). La inhibición de este neurotransmisor no facilita el orejeo (*ear wiggling*), una de las conductas proceptivas típicamente desplegadas por las ratas en estro (Meston y cols. 1996). Además, se conoce que el HVM, el cual es un área relacionada con el despliegue de la CE, se encuentra densamente innervado por terminales nerviosas noradrenérgicas. Asimismo, se ha observado que la administración de E₂ y P₄ modifica el recambio de NA en el HVM (Etgen 1992), ya que estudios realizados a través de microdiálisis directamente en el HVM, han mostrado que el inicio de la CE inducida por hormonas se asocia a un incremento en la liberación de NA (Vathy y cols. 1987, Etgen 1992). De hecho, las drogas que inhiben la síntesis de NA suprimen la CE inducida por estrógenos y P₄ en ratas y cuyos (Everitt y cols. 1975, Crowley y cols. 1976) y la destrucción de la innervación noradrenérgica ascendente del hipotálamo, suprime la expresión de dicha conducta (Hansen y cols. 1980). Por lo tanto, la NA es un importante mediador de la CE. Un apoyo más a esta idea, son los datos obtenidos en nuestro laboratorio en donde encontramos que la proceptividad inducida por la estimulación vaginocervical fue bloqueada por la administración de dos antagonistas de los receptores $\alpha 1$ -noradrenérgicos, la prazocina y la fenoxibenzamina (González-Flores y cols. 2007).

A pesar de lo anteriormente expuesto, con la técnica de hibridación *in-situ*, se ha encontrado que la leptina al ser administrada por vía icv activa a las neuronas hipotalámicas ventromediales que se asocian con la facilitación de la lordosis (Schwartz y cols. 1996), pero actualmente son muy pocos los datos en la literatura, que han mostrado la localización del receptor de leptina en alguno de los núcleos hipotalámicos, sobre todo en los ventromediales o los laterales (Elmqvist y cols. 1998, Funahashi y cols. 2003).

Interesantemente, una proporción significativa de ratas tratadas con leptina mostraron conducta de rechazo de manera intensa y persistente con la dosis de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a los 120 minutos, conductas que raramente son observadas en ratas que despliegan CE normal (lordosis y proceptividad). Estos resultados nos llevan a reflexionar acerca de que un mecanismo

inhibitorio, incompatible con la expresión de la CE, es gradualmente activado al aumentar la dosis de leptina.

Nuestros resultados del experimento dos, sugieren que el efecto de la leptina sobre la expresión de la CL puede ser mediado a través de la activación del receptor GnRH-1, ya que la administración icv de antide (antagonista para este receptor), bloqueó significativamente la CL inducida tanto por 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de leptina a los 60 y 120 minutos, así como por 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de leptina a los 60, 120 y 240 minutos. Esta interpretación es fuertemente apoyada por los datos en donde se ha reportado que la leptina estimula la liberación de la GnRH ya que ejerce su efecto tanto a nivel de los cuerpos celulares del APOm, así como en las terminales axónicas de las neuronas de la eminencia media (EM), de ratas hembras ovx pretratadas con E_2 y P_4 y sometidas a ayuno (Watanobe 2002). Sin embargo, la secreción de GnRH por leptina en ratas pretratadas con E_2 y alimentadas *ad libitum* puede no involucrar acciones directas de la leptina sobre las neuronas GnRHérgicas, ya que estudios realizados con las técnicas de hibridación *in situ* e inmunocitoquímica en ratas y monos, muestran que muy pocas, si no es que ninguna, de estas neuronas poseen receptores para la leptina (Finn y cols. 1998, Hakansson y cols. 1998, Quennell y cols. 2009). Esto sugiere que la estimulación de la liberación de la GnRH por leptina es mediada a través de la activación de neuronas aferentes que proyectan axones a las células secretoras de la GnRH (Cunningham y cols. 1999). Por lo tanto, podemos especular que existen neurotransmisores intermediarios involucrados en la liberación de la GnRH inducida por leptina, ya que las neuronas GnRHérgicas reciben un rico aporte aferente de axones terminales que contienen una gran variedad de compuestos incluyendo; catecolaminas como la serotonina, al GABA, al glutamato o bien péptidos y opioides e incluso al neuropéptido Y, el péptido intestinal vasoactivo (VIP de sus siglas en inglés), la neurotensina, la sustancia P y la kisspeptina (ver revisión; Clarke y Pompolo 2005). Sin embargo, el efecto de la leptina modulando la liberación de estos neurotransmisores, no ha sido dilucidado completamente.

Además, en algunos casos la leptina más que estimular la liberación de esos neurotransmisores, los inhibe. Por ejemplo, se conoce que el GABA es un neurotransmisor inhibitorio, presente en altas concentraciones en el hipotálamo (Mueller 1984), que inhibe la liberación de NA a través de ejercer su efecto sobre su receptor GABA-A localizado en las

neuronas presinápticas (Fuchs y cols. 1984), ya que la administración de un antagonista del receptor GABA-A, la bicuculina, bloqueó la disminución de NA (Mueller y cols. 1984) en el hipotálamo y no así con el uso del Faclofen, un antagonista del receptor GABA-B (Sakamaki y cols. 2004).

Uno de los eventos mayormente documentados sobre la liberación de la GnRH por leptina, son los efectos que ejerce la kisspeptina en neuronas GnRHérgicas (Smith y cols. 2006, Kauffman y cols. 2007), ya que claramente se ha establecido que la kisspeptina (hormona que inicialmente se encontró que bloqueaba algunos efectos cancerígenos inducidos por los estrógenos en la glándula mamaria) induce la liberación de la GnRH. Así, se conoce que un gran número de neuronas kisspeptinérgicas en el Narc de la rata y el ratón expresan receptores a leptina. Estas neuronas productoras de kisspeptina juegan un papel muy importante en diferentes eventos reproductivos, ya que proyectan sus axones hacia el cerebro anterior, particularmente hacia el APOM, área cerebral en donde se localizan las neuronas GnRHérgicas (Canteras y cols. 1994, Simonian y cols. 1999), por lo que la liberación de la GnRH se produce administrando, por vía icv, dosis bajas de kisspeptina (Gottsche y cols. 2004, Irwig y cols. 2004, Messenger y cols. 2005). Por otro lado, experimentos realizados en la rata, han mostrado que las fibras que contienen kisspeptina se encuentran traslapadas con las neuronas GnRHérgicas (Kinoshita y cols. 2005), pero además, una gran cantidad de neuronas GnRHérgicas expresan al receptor a proteína G54 (GPR54) kisspeptinérgico (Irwig y cols. 2004), lo que sugiere que la kisspeptina puede modular directamente la secreción de la GnRH (Irwig y cols. 2004, Messenger y cols. 2005).

Otras evidencias de que la leptina, a través de la liberación de la GnRH, induce CL, es por el hecho de que la inyección sistémica de la GnRH facilita la lordosis en ratas hembras pretratadas con estrógenos de manera independiente a su efecto sobre la liberación de gonadotrofinas o corticoides suprarrenales (Moss y McCann 1973, Pfaff 1973). El mismo efecto es obtenido con la sola administración de fragmentos de la GnRH, directamente en el tercer ventrículo, que también facilita la expresión de la CL (Edwards y cols. 1968). Además en la tarde del proestro se produce un dramático aumento en los niveles de la GnRH, que se piensa, contribuyen con la facilitación de la CE (Moss y McCann 1973). Sin embargo, los niveles séricos de la leptina no cambian significativamente durante el ciclo estral de la rata

(Amico y cols. 1998), pero si existen variaciones cíclicas en la expresión de los receptores de leptina en el sistema nervioso, encontrándose niveles más bajos durante el proestro que durante las demás etapas del ciclo estral (Bennett y cols. 1999), por lo que se puede pensar que la leptina provoca una regulación a la baja de sus receptores en esta etapa del ciclo estral, justamente antes de provocar la liberación del GnRH.

Ahora bien, actualmente ha tomado una gran relevancia el papel que juega el RP sobre la expresión de la CE en roedores, proponiéndose a éste como el mediador molecular común por el cual una gran variedad de compuestos inducen la expresión de la CE (Beyer y cols. 2003, Mani y Portillo 2010). Así, el uso de antiprogestinas (como el RU486), que ejercen sus efectos antagónicos sobre este receptor y que se sabe que bloquean la CE inducida por progestinas, péptidos, nucleótidos cíclicos y hasta prostaglandinas, ha favorecido el fortalecimiento de esta propuesta (Beyer y cols. 2003, Mani y Portillo 2010). Con los datos obtenidos en esta tesis, en donde la lordosis inducida por 1 y 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de leptina fue inhibida por el RU486 a los 60 y 120 minutos, se incluye a la leptina en la lista de agentes que ejercen su efecto lordogénico a través de la activación del RP, además, por el hecho de que una abundante proporción de neuronas hipotalámicas que expresan a los RPs contienen receptores de estrógenos (Warembourg y cols. 1989, Turcotte y Blaustein 1993, Greco y cols. 2001) y son también inmunorreactivas para el receptor a la leptina (Diano y cols. 1998) y la modulación de la actividad del RP que resulta en la facilitación de la lordosis, puede producirse cuando la leptina se une con su receptor Ob-Rb.

Además, el hecho de que el RP sea una fosfoproteína activada por diferentes proteínas cinasas y que la leptina activa (directa o indirectamente) esas vías de señalización (Sweeney 2002, Fruhbeck 2006) favorece la idea de que la leptina, a través de inducir la fosforilación del RP puede activar la expresión de la CL. Por ejemplo, la GnRH liberada por leptina y actuando sobre su receptor provoca la hidrólisis del fosfatidil inositol (Wang y cols. 1989) y la subsecuente activación de la cinasa C en diversos órganos reproductivos (Conn y cols. 1987). Este sistema ha sido involucrado en la regulación de la CE ya que utilizando inhibidores de la proteína cinasa C se ha logrado bloquear la CE inducida por progestinas y agentes no esteroideos (González-Flores y cols. 2006, Ramírez-Orduña y cols. 2007). Además, la leptina también estimula a la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK), cinasas que fosforilan al RP en los residuos de serina 20, 294 y 345 (Lange 2004), provocando su

activación.

Recientemente, nuestro grupo de investigación encontró que bloqueando esta vía de la MAPK, a través de la administración icv del PD98059 (inhibidor de la vía de la MAPK), se logró inhibir la CE inducida tanto por progestinas, agentes no esteroideos y por la estimulación vagino-cervical (González-Flores y Etgen 2004, González-Flores y cols. 2004, Acosta-Martínez y cols. 2006, González-Flores y cols. 2008, González-Flores y cols. 2009).

El GnRH liberado por leptina también podría estimular la CL al interactuar con receptores membranales acoplados al sistema de la adenilato ciclasa-AMPC-cinasa A (Fraser 1979, Arora y cols. 1998, Ulloa-Aguirre y cols. 1998). Este mecanismo es apoyado por el hecho de que la inhibición farmacológica de la proteína cinasa A bloquea la CL en ratas ovx pretratadas con BE (González-Flores y cols. 2006, González-Flores y cols. 2008). Además, el efecto estimulador de la GnRH en la CL es potenciado y prolongado por la administración simultánea de inhibidores de fosfodiesterasas (Beyer 1982), los cuales evitan la degradación de AMPC. Por lo tanto, es posible que la GnRH facilite la expresión de la lordosis aumentando los niveles de AMPC en neuronas relacionadas con la CL.

Finalmente, en esta parte de la discusión integraremos el efecto que ejerce la leptina sobre la liberación de la GnRH y su posible comunicación cruzada (cross-talk en inglés) con el RP. Los trabajos en los cuales se comenzó a proponer a la leptina como una hormona liberadora de GnRH, fue estudiando los efectos de esta hormona sobre neuronas GnRHérgicas durante el inicio de la pubertad (Ahima y Flier 2000, Mann y Plant 2002). Así, bajo condiciones naturales, en las cuales se intercalan frecuentes periodos de anestro, producidos por las variaciones en la disposición de alimento, dentro de la vida reproductiva de la rata (Knuth y Friesen 1983), la leptina participa en el reinicio de la actividad reproductiva, incluyendo la CL por la estimulación directa o indirecta de las neuronas secretoras de GnRH. Esta idea es apoyada por el hecho de que el anestro inducido por el ayuno, en el hámster Sirio, es revertido por la administración de leptina (Schneider y cols. 1998). La leptina participa en el reinicio de dicha actividad, debido a que el desarrollo sexual y la reproducción son procesos que demandan energía ya que se ha propuesto a la leptina como la hormona que informa al SNC del estado nutricional, la grasa corporal (Vogel 1996), la regulación del apetito, la ingesta de alimento y el gasto energético (Campfield y cols. 1995, Halaas y cols. 1995, Pelleymounter y

cols. 1995). Por lo tanto, para reactivar a las conductas reproductivas es esencial que el SNC reciba información de que las reservas energéticas son suficientes para permitir el desarrollo de los procesos reproductivos sin afectar la supervivencia del individuo.

9. CONCLUSIÓN

La administración central de la leptina puede activar simultáneamente diferentes mecanismos con respuestas opuestas: (1) Un mecanismo estimulador a través de la liberación de la GnRH, que al actuar sobre su receptor membranal provoque la activación de diferentes proteínas cinasas que fosforilen al RP. Tal mecanismo podría ser el desencadenador de la conducta de lordosis y (2) un mecanismo inhibitorio de la liberación de NA, que incrementaría las conductas de rechazo. Cabe la posibilidad de que, en condiciones naturales, estas conductas se presenten de manera independiente y lo que las active sean las condiciones nutricionales y metabólicas que en su momento reciba la hembra.

10. PERSPECTIVAS

Podrían realizarse estudios para explorar los mecanismos intracelulares por los cuales la leptina pudiera ejercer la expresión de la CL, ya que se conoce que diferentes vías de señalización como la del óxido nítrico, la proteína cinasa A, la cinasa C, la MAPk e incluso de la JAK, son activadas por este péptido y además han sido claramente involucradas en la regulación de la CL por diferentes compuestos.

Por otro lado, sería de suma importancia realizar experimentos en condiciones del animal en ayuno, para poder determinar la influencia de la leptina sobre el balance energético y su regulación sobre la fisiología reproductiva de las hembras ovx pretratadas con BE con o sin P₄. En estas condiciones se podría esperar que la leptina previniera los efectos inhibitorios que se han observado en otras especies de roedores y que son provocados por el ayuno, sobre el despliegue de la CE.

11. REFERENCIAS

- Acosta-Martínez M, González-Flores O y Etgen AM. 2006. The role of progestin receptors and the mitogen-activated protein kinase pathway in delta opioid receptor facilitation of female reproductive behaviors. *Horm Behav* 49: 458-462.
- Agmo A, Soria P y Paredes R. 1989. Gabaergic drugs and lordosis behavior in the female rat. *Horm Behav* 23: 368-389.
- Ahdieh HB, Brown TJ, Wade GN y Blaustein JD. 1986. Hypothalamic nuclear progestin receptor and the duration of sexual receptivity in ovariectomized and ovariectomized-hysterectomized rats. *Physiol Behav* 36: 211-215.
- Ahima RS, Bjorbaek C, Osei S y Flier JS. 1999. Regulation of neuronal and glial proteins by leptin: implications for brain development. *Endocrinology* 140: 2755-2762.
- Ahima RS, Dushay J, Flier SN, Prabakaran D y Flier JS. 1997. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin Invest* 99: 391-395.
- Ahima RS y Flier JS. 2000. Leptin. *Annu Rev Physiol* 62: 413-437.
- Ahima RS, Prabakaran D y Flier JS. 1998. Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *J Clin Invest* 101: 1020-1027.
- Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E y Flier JS. 1996. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382: 250-252.
- Amico JA, Thomas A, Crowley RS y Burmeister LA. 1998. Concentrations of leptin in the serum of pregnant, lactating, and cycling rats and of leptin messenger ribonucleic acid in rat placental tissue. *Life Sci* 63: 1387-1395.
- Aparicio SA. 2005. Kisspeptins and GPR54--the new biology of the mammalian GnRH axis. *Cell Metab* 1: 293-296.
- Apostolakis EM, Garai J, Fox C, Smith CL, Watson SJ, Clark JH y O'Malley BW. 1996. Dopaminergic regulation of progesterone receptors: brain D5 dopamine receptors mediated induction of lordosis by D1-like agonists in rat. *J Neurosci* 16: 4823-4834.
- Ariens EJ. 1964. Molecular basis of drug action. *Med Arh* 18: 21-38.
- Arora KK, Krsmanovic LZ, Mores N, O'Farrell H y Catt KJ. 1998. Mediation of cyclic AMP

- signaling by the first intracellular loop of the gonadotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem* 273: 25581-25586.
- Baba Y, Matsuo H y Schally AV. 1971. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. II. Confirmation of the proposed structure by conventional sequential analyses. *Biochem Biophys Res Commun* 44: 459-463.
- Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermogant S y Laigneau JP. 1998. The stomach is a source of leptin. *Nature* 394: 790-793.
- Bagchi MK, Tsai SY, Tsai MJ y O'Malley BW. 1991. Progesterone enhances target gene transcription by receptor free of heat shock proteins hsp90, hsp56, and hsp70. *Mol Cell Biol* 11: 4998-5004.
- Bahrenberg G, Behrmann I, Barthel A, Hekerman P, Heinrich PC, Joost HG y Becker W. 2002. Identification of the critical sequence elements in the cytoplasmic domain of leptin receptor isoforms required for Janus kinase/signal transducer and activator of transcription activation by receptor heterodimers. *Mol Endocrinol* 16: 859-872.
- Bai W y Weigel NL. 1995. Phosphorylation and steroid hormone action. *Vitam Horm* 51: 289-313.
- Bamberger AM, Bamberger CM, Wald M, Kratzmeier M y Schulte HM. 1996. Protein kinase C (PKC) isoenzyme expression pattern as an indicator of proliferative activity in uterine tumor cells. *Mol Cell Endocrinol* 123: 81-88.
- Banks AS, Davis SM, Bates SH y Myers MG, Jr. 2000. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem* 275: 14563-14572.
- Barfield RJ y Chen JJ. 1977. Activation of estrous behavior in ovariectomized rats by intracerebral implants of estradiol benzoate. *Endocrinology* 101: 1716-1725.
- Barr ML y Kiernan JA. 1994. Desarrollo, Composición y Evolución del Sistema Nervioso. En: *el Sistema Nervioso Humano: Un Punto de Vista Anatómico*. Barr ML y Kiernan JA (eds.) Editorial. Harla. México DF. pp. 3-13.
- Baulieu EE. 1991. On the mechanism of action of RU486. *Ann N Y Acad Sci* 626: 545-560.
- Bazan JF. 1990. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 6934-6938.
- 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 y Sánchez-Pacheco A. 1996. Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocrine Rev* 17: 587-609.
- Beck CA, Estes PA, Bona BJ, Muro-Cacho CA, Nordeen SK y Edwards DP. 1993. The steroid antagonist RU486 exerts different effects on the glucocorticoid and progesterone receptors. *Endocrinology* 133: 728-740.
- Bennett PA, Lindell K, Wilson C, Carlsson LM, Carlsson B y Robinson IC. 1999. Cyclical variations in the abundance of leptin receptors, but not in circulating leptin, correlate with NPY expression during the oestrous cycle. *Neuroendocrinology* 69: 417-423.
- Bereiter DA y Jeanrenaud B. 1979. Altered neuroanatomical organization in the central nervous system of the genetically obese (ob/ob) mouse. *Brain Res* 165: 249-260.
- Beyer C. 1980. A Model for Explaining Estrogen Progesterone Interactions in Induction of Lordosis Behavior. En: *Endocrinology*. Camnusigs IA, Fander JW y Mendelshon FAD (eds.) Editorial. Camberra. Australia. pp. 101-104.
- Beyer C y Canchola E. 1981. Facilitation of progesterone induced lordosis behavior by phosphodiesterase inhibitors in estrogen primed rats. *Physiol Behav* 27: 731-733.
- Beyer C, Canchola E y Larsson K. 1981. Facilitation of lordosis behavior in the ovariectomized estrogen primed rat by dibutyryl cAMP. *Physiol Behav* 26: 249-251.
- Beyer C, Gómora P, Canchola E y Sandoval Y. 1982. 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* 44: 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 y González-Mariscal G. 1991. Effects of Progesterone and Natural Progestins in

- Brain. En: *Reproduction, Growth and Development*. Negro Vilar A y Pérez-Palacios G. (eds.) Editorial. Raven Press. New York. pp. 199-208.
- 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, González-Mariscal G, Eguibar JR y Gómora P. 1988. Lordosis facilitation in estrogen primed rats by intrabrain injection of pregnanes. *Pharmacol Biochem Behav* 31: 919-926.
- Beyer C, Morali G y Vargas R. 1971. Effect of diverse estrogens on estrous behavior and genital tract development in ovariectomized rats. *Horm Behav* 2: 273-277.
- Bjorbaek C y Kahn BB. 2004. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res* 59: 305-331.
- Blaustein JD. 1982. Progesterone in high doses may overcome progesterone's desensitization effect on lordosis by translocation of hypothalamic progestin receptors. *Horm Behav* 16: 175-190.
- Blaustein JD y Feder HH. 1979. Cytoplasmic progestin receptors in guinea pig brain: characteristics and relationship to the induction of sexual behavior. *Brain Res* 169: 481-497.
- Blaustein JD y Feder HH. 1980. Nuclear progestin receptors in guinea-pig brain measured by an in vitro exchange assay after hormonal treatment that affects lordosis. *Endocrinology* 106: 1061-1069.
- Blaustein JD, Finkbohner R y Delville Y. 1987. Estrogen-induced and estrogen-facilitated female rat sexual behavior is not mediated by progestin receptors. *Neuroendocrinology* 45: 152-159.
- Blaustein JD y Wade GN. 1978. Progestin binding by brain and pituitary cell nuclei and female rat sexual behavior. *Brain Res* 140: 360-367.
- Boden G, Chen X, Mozzoli M y Ryan I. 1996. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 3419-3423.
- Boivin G, Anthoine-Terrier C y Morel G. 1994. Ultrastructural localization of endogenous hormones and receptors in bone tissue: an immunocytological approach in frozen

samples. *Micron* 25: 15-27.

- Boling JL y Blandau R. 1939. The estrogen-progesterone induction of mating responses in the spayed female rats. *Endocrinology* 25: 359-364.
- Bornstein SR, Licinio J, Tauchnitz R, Engelmann L, Negrao AB, Gold P y Chrousos GP. 1998. Plasma leptin levels are increased in survivors of acute sepsis: associated loss of diurnal rhythm, in cortisol and leptin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 280-283.
- Bornstein SR, Uhlmann K, Haidan A, Ehrhart-Bornstein M y Scherbaum WA. 1997. Evidence for a novel peripheral action of leptin as a metabolic signal to the adrenal gland: leptin inhibits cortisol release directly. *Diabetes* 46: 1235-1238.
- Brookhart JM, Dey FL y Ranson SW. 1941. The abolition of mating behavior by hypothalamic lesions in guinea pigs. *Endocrinology* 28: 561-565.
- Brookhart JM, Dey FL y Ranson SW. 1940. Failure of ovarian hormones to cause mating reactions in spayed guinea pigs with hypothalamic lesions. *Proc Soc Exp Biol Med* 44: 61-64.
- Brown TJ y Blaustein JD. 1986. Abbreviation of the period of sexual behavior in female guinea pigs by the progesterone antagonist RU 486. *Brain Res* 373: 103-113.
- Brown TJ y Blaustein JD. 1984. Inhibition of sexual behavior in female guinea pigs by a progestin receptor antagonist. *Brain Res* 301: 343-349.
- 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.
- Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R y Burn P. 1995. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269: 546-549.
- Canteras NS, Simerly RB y Swanson LW. 1994. Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *J Comp Neurol* 348: 41-79.

- Carroll RS, Glowacka D, Dashner K y Black PM. 1993. Progesterone receptor expression in meningiomas. *Cancer Res* 53: 1312-1316.
- Carlson NR. 1998. *Physiology of Behavior*, sixth edition. Editorial. Allyn and Bacon. Boston.
- Chirino R, González-Mariscal G, carrillo P, Pacheco P y Hudson R. 1993. Effect of removing the chin gland on chin-marking behavior in male rabbits of the New Zealand race. *Z Saugetierk* 58: 116-121.
- Cizza G, Lotsikas AJ, Licinio J, Gold PW y Chrousos GP. 1997. Plasma leptin levels do not change in patients with Cushing's disease shortly after correction of hypercortisolism. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 2747-2750.
- Clarke IJ y Pompolo S. 2005. Synthesis and secretion of GnRH. *Anim Reprod Sci* 88: 29-55.
- Clegg MT y Ganong WF. 1960. The effect of hypothalamic lesions on ovarian function in the ewe. *Endocrinology* 67: 179-186.
- Clegg MT, Santolucito JA, Smith JD y Ganong WF. 1958. The effect of hypothalamic lesions on sexual behavior and estrous cycles in the ewe. *Endocrinology* 62: 790-797.
- Clemens LG y Weaver DR. 1985. The Role of Gonadal Hormones in the Action of Feminine Sexual Behavior. En: *Handbook of Behavioral Neuroendocrinology*. Adler NT, Pfaff D y Goy RW (eds.) Editorial. Plenum Press. New York and London. pp. 1833-1858.
- Conn PM, McArdle CA, Andrews WV y Huckle WR. 1987. The molecular basis of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action in the pituitary gonadotrope. *Biol Reprod* 36: 17-35.
- Conneely OM, Dobson AD, Tsai MJ, Beattie WG, Toft DO, Huckaby CS, Zarucki T, Schrader WT y O'Malley BW. 1987. Sequence and expression of a functional chicken progesterone receptor. *Mol Endocrinol* 1: 517-525.
- Conneely OM, Mulac-Jericevic B y Lydon JP. 2003. Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids* 68: 771-778.
- Considine RV y Caro JF. 1997. Leptin and the regulation of body weight. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 1255-1272.
- Corodimas KP y Morrell JI. 1990. Estradiol-concentrating forebrain and midbrain neurons project directly to the medulla. *J Comp Neurol* 291: 609-620.

- Crowley WR, Feder HH y Morin LP. 1976. Role of monoamines in sexual behavior of female guinea pig. *Pharmacol Biochem Behav* 4: 67-71.
- Cunningham MJ, Clifton DK y Steiner RA. 1999. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol Reprod* 60: 216-222.
- Czaja JA, Goldfoot DA y Karavolas H. 1974. Comparative facilitation and inhibition of lordosis in the guinea pig with progesterone, 5 α -pregnane-3-20-dione or 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one. *Horm Behav* 5: 201-274.
- Chalepakis G, Postma JP y Beato M. 1988. A model for hormone receptor binding to the mouse mammary tumour virus regulatory element based on hydroxyl radical footprinting. *Nucleic Acids Res* 16: 10237-10247.
- 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.
- Chehab FF, Lim ME y Lu R. 1996. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* 12: 318-320.
- Chehab FF, Mounzih K, Lu R y Lim ME. 1997. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science* 275: 88-90.
- Chen L, Sato M, Inoko H y Kimura M. 1997. Molecular cloning and analysis of novel cDNAs specifically expressed in adult mouse testes. *Biochem Biophys Res Commun* 240: 261-268.
- Cheung CC, Thornton JE, Kuijper JL, Weigle DS, Clifton DK y Steiner RA. 1997. Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology* 138: 855-858.
- Chu HP y Etgen AM. 1997. A potential role of cyclic GMP in the regulation of lordosis behavior of female rats. *Horm Behav* 32: 125-132.
- Chu SC, Chou YC, Liu JY, Chen CH, Shyu JC y Chou FP. 1999. Fluctuation of serum leptin level in rats after ovariectomy and the influence of estrogen supplement. *Life Sci* 64: 2299-2306.
- Danforth DR, Williams RF, Gordon K, Leal JA y Hodgen GD. 1991. Inhibition of pituitary gonadotropin secretion by the gonadotropin-releasing hormone antagonist antide. II. Development of an in vitro bioassay for characterization of pharmacokinetics and

- pharmacodynamics of antide in circulation. *Endocrinology* 128: 2041-2044.
- Davis PG, McEwen BS y Pfaff DW. 1979. Localized behavioral effects of tritiated estradiol implants in the ventromedial hypothalamus of female rats. *Endocrinology* 104: 898-903.
- de Catanzaro D, Gray DS y Gorzalka BB. 1981. Effects of acute central and peripheral ACTH1-24 administration on lordosis behavior. *Physiol Behav* 26: 207-213.
- DeBold J y Malsbury CW. 1989. Facilitation of sexual receptivity by hypothalamic and midbrain implants of progesterone in female hamsters. *Physiol Behav* 46: 655-660.
- DeMarzo AM, Onate SA, Nordeen SK y Edwards DP. 1992. Effects of the steroid antagonist RU486 on dimerization of the human progesterone receptor. *Biochemistry* 31: 10491-10501.
- Dempsey EW, Hertz R y Young WC. 1936. The experimental induction of oestrus (sexual receptivity) in the normal and ovariectomized guinea pig. *Am J Physiol* 116: 201-209.
- Denner LA, Weigel NL, Maxwell BL, Schrader WT y O'Malley BW. 1990. Regulation of progesterone receptor-mediated transcription by phosphorylation. *Science* 250: 1740-1743.
- Dewsbury DA. 1967. A quantitative description of the behavior of rats during copulation. *Behaviour* 29: 154-178.
- Dey FL, Fisher C, Berry CM y Ranson SW. 1940. Disturbances in reproductive functions caused by hypothalamic lesions in female guinea pigs. *Am J Physiol* 129: 39-46.
- Dey FL, Lenninger CR y Ranson SW. 1942. The effects of hypothalamic lesions on mating behavior in female guinea pigs. *Endocrinology* 30: 323-326.
- Diano S, Kalra SP, Sakamoto H y Horvath TL. 1998. Leptin receptors in estrogen receptor-containing neurons of the female rat hypothalamus. *Brain Res* 812: 256-259.
- Dohanich GP, Barr PJ, Witcher JA y Clemens LG. 1984. Pharmacological and anatomical aspects of cholinergic activation of female sexual behavior. *Physiol Behav* 32: 1021-1026.
- Dornan WA, Bloch GJ, Priest CA y Micevych PE. 1989. Microinjection of cholecystokinin into the medial preoptic nucleus facilitates lordosis behavior in the female rat. *Physiol Behav* 45: 969-974.

- Dudley CA, Jamison TS y Moss RL. 1982. Inhibition of lordosis behavior in the female rat by intraventricular infusion of prolactin and by chronic hyperprolactinemia. *Endocrinology* 110: 677-679.
- Dudley CA y Moss RL. 1976. Facilitation of lordosis in the rat by prostaglandin E2. *J Endocrinology* 71: 457-458.
- Edwards DA, Wardell SE y Boonyaratanakornkit V. 2003. Progesterone receptor interacting coregulatory proteins and cross talk with cell signaling pathways. *J Steroid Biochem* 83: 173-186.
- Edwards DP, Weigel NL, Nordeen SK y Beck CA. 1993. Modulators of cellular protein phosphorylation alter the trans-activation function of human progesterone receptor and the biological activity of progesterone antagonists. *Breast Cancer Res Treat* 27: 41-56.
- Edwards DP, Whalen RE y Nadler RD. 1968. Induction of estrus: estrogen-progesterone interactions. *Physiol Behav* 3: 29-33.
- Elmqvist JK, Ahima RS, Maratos-Flier E, Flier JS y Saper CB. 1997. Leptin activates neurons in ventrobasal hypothalamus and brainstem. *Endocrinology* 138: 839-842.
- Elmqvist JK, Bjorbaek C, Ahima RS, Flier JS y Saper CB. 1998. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol* 395: 535-547.
- Erskine MS. 1989. Solicitation behavior in the estrous female rat: a review. *Horm Behav* 23: 473-502.
- Escobar-Morreale HF, Escobar del Rey F y Morreale de Escobar G. 1997. Thyroid hormones influence serum leptin concentrations in the rat. *Endocrinology* 138: 4485-4488.
- Etgen AM. 1990. Intrahypothalamic implants of noradrenergic antagonists disrupt lordosis behavior in female rats. *Physiol Behav* 48: 31-36.
- Etgen AM. 1984. Progestin receptors and the activation of female reproductive behavior: a critical review. *Horm Behav* 18: 411-430.
- 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 AMP, N. 1992. Estradiol and progesterone modulation of norepinephrine neurotransmission: implications for the regulation of female reproductive behavior.

- Neuroendocrinology 4: 255-271.
- Eto T, Masuda H, Susuki Y y Hosi T. 1962. Progesterone and pregnan-4-en-20 α -ol-3-one in the rat ovarian venous blood at different stages in reproductive cycle. *J Anim Reprod* 8: 47-58.
- Everitt BJ, Fuxe K, Hokfelt FT y Jonsson G. 1975. Role of monoamines in the control by hormones of sexual receptivity in the female rat. *J Comp Physiol Psychol* 89: 556-572.
- Eyckerman S, Broekaert D, Verhee A, Vandekerckhove J y Tavernier J. 2000. Identification of the Y985 and Y1077 motifs as SOCS3 recruitment sites in the murine leptin receptor. *FEBS Lett* 486: 33-37.
- Farooqi IS. 2002. Leptin and the onset of puberty: insights from rodent and human genetics. *Semin Reprod Med* 20: 139-144.
- Feil PD, Clarke CL y Satyaswaroop PG. 1988. Progestin-mediated changes in progesterone receptor forms in the normal human endometrium. *Endocrinology* 123: 2506-2513.
- Fernández-Guasti A, Larsson K y Beyer C. 1985. Potentiative action of α and β 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.
- Finn PD, Clifton DK y Steiner RA. 1998. The regulation of galanin gene expression in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Mol Cell Endocrinol* 140: 137-142.
- Floody OR, Lisk RD y Vomachka AJ. 1986. Facilitation of lordosis by estradiol in the mesencephalic central gray. *Physiol Behav* 37: 587-595.
- Foreman MM y Moss RL. 1979. Role of hypothalamic dopaminergic receptors in the control of lordosis behavior in the female rat. *Physiol Behav* 22: 283-289.
- Fox AS y Olster DH. 2000. Effects of intracerebroventricular leptin administration on feeding and sexual behaviors in lean and obese female Zucker rats. *Horm Behav* 37: 377-387.
- Francis J, MohanKumar SM y MohanKumar PS. 2004. Leptin inhibits norepinephrine efflux from the hypothalamus in vitro: role of gamma aminobutyric acid. *Brain Res* 1021: 286-291.
- Fraser HM. 1979. Releasing Hormones. En: *Reproduction in Mammals of Hormone Action*.

- Austin CR (eds.) Editorial. Cambridge Univ Press. London/New York Cambridge. pp. 1-54.
- Frederich RC, Lollmann B, Hamann A, Napolitano-Rosen A, Kahn BB, Lowell BB y Flier JS. 1995. Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents. Impact of nutrition and obesity. *J Clin Invest* 96: 1658-1663.
- Freeman ME. 1994. The Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E y Neill JD (eds.) Editorial. Raven Press. New York. pp. 613-658.
- Fruhbeck G. 2006. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J* 393: 7-20.
- Fruhbeck G, Jebb SA y Prentice AM. 1998. Leptin: physiology and pathophysiology. *Clin Physiol* 18: 399-419.
- Frye CA y DeBold JF. 1992. Muscimol facilitates sexual receptivity in hamsters when infused into the ventral tegmentum. *Pharmacol Biochem Behav* 42: 879-887.
- Frye CA, Van Keuren KR, Rao PN y Erskine MS. 1996. Progesterone and 3 alpha-androstanediol conjugated to bovine serum albumin affects estrous behavior when applied to the MBH and POA. *Behav Neurosci* 110: 603-612.
- Funahashi H, Yada T, Suzuki R y Shioda S. 2003. Distribution, function, and properties of leptin receptors in the brain. *Int Rev Cytol* 224: 1-27.
- Gastaut H. 1952. Correlations entre le systeme nerveux vegetatif et le systeme de la vie de relation dans le rhinencephale. *J Physiol Paris* 44: 431-470.
- Gestrin ED, White RB y Fernald RD. 1999. Second form of gonadotropin-releasing hormone in mouse: immunocytochemistry reveals hippocampal and periventricular distribution. *FEBS Lett* 448: 289-291.
- Ghilardi N y Skoda RC. 1997. The leptin receptor activates janus kinase 2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line. *Mol Endocrinol* 11: 393-399.
- Glaser JH y Barfield RJ. 1984. Blockade of progesterone-activated estrous behavior in rats by intracerebral anisomycin is site specific. *Neuroendocrinology* 38: 337-343.
- Glaser JH, Etgen AM y Barfield RJ. 1985. Intrahypothalamic effects of progestin agonists on estrous behavior and progestin receptor binding. *Physiol Behav* 34: 871-877.
- Glaser JH, Rubin BS y Barfield RJ. 1983. Onset of the receptive and proceptive components

- of feminine sexual behavior in rats following the intravenous administration of progesterone. *Horm Behav* 17: 18-27.
- Gómora-Arrati P, Beyer C, Lima-Hernández FJ, Gracia ME, Etgen AM y González-Flores 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, 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 ring A-reduced metabolites. *Horm Behav* 45: 50-57.
- González-Flores O, Etgen AM, Komisaruk BK, Gómora-Arrati P, Macías-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, PGE2 and db-cAMP in rats. *Physiol Behav* 96: 606-612.
- 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. 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-Mariscal G y 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.
- 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, Zavala A, Chirino R y Beyer C. 1993. Sex steroid regulation of chin-marking behavior in male New Zealand rabbits. *Physiol Behav* 54: 1035-1040.
- Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, Seminara S, Clifton DK y Steiner RA. 2004. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 145: 4073-4077.
- Goy RW y Phoenix CH. 1963. Hypothalamic regulation of female sexual behaviour; establishment of behavioural oestrus in spayed guinea-pigs following hypothalamic lesions. *J Reprod Fertil* 5: 23-40.
- Grant EC y Mackintosh JH. 1963. Comparison of the social postures of some common laboratory rodents. *Behaviour* 21: 246-259.
- Greco B, Allegretto EA, Tetel MJ y Blaustein JD. 2001. Coexpression of ER beta with ER alpha and progestin receptor proteins in the female rat forebrain: effects of estradiol treatment. *Endocrinology* 142: 5172-5181.
- Greer MA. 1953. The effect of progesterone on persistent vaginal estrus produced by hypothalamic lesions in the rat. *Endocrinology* 53: 380-390.
- Gruaz NM, Lalaoui M, Pierroz DD, Englaro P, Sizonenko PC, Blum WF y Aubert ML. 1998. Chronic administration of leptin into the lateral ventricle induces sexual maturation in severely food-restricted female rats. *J Neuroendocrinol* 10: 627-633.
- Grunfeld C, Zhao C, Fuller J, Pollack A, Moser A, Friedman J y Feingold KR. 1996. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. *J Clin Invest* 97: 2152-2157.
- Guerra-Araiza C, Gómora-Arrati P, García-Juárez M, Armengual-Villegas A, Miranda-Martínez A, Lima-Hernández FJ, Camacho-Arroyo I y González-Flores O. 2009. Role of progesterone receptor isoforms in female sexual behavior induced by progestins in rats. *Neuroendocrinology* 90: 73-81.
- Hagan CR, Faivre EJ y Lange CA. 2009. Scaffolding actions of membrane-associated

- progesterone receptors. *Steroids* 74: 568-572.
- Hakansson ML, Brown H, Ghilardi N, Skoda RC y Meister B. 1998. Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *J Neurosci* 18: 559-572.
- Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK y Friedman JM. 1995. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269: 543-546.
- Hall NR, Luttge WG y Berry RB. 1975. Intracerebral prostaglandin E2: effects upon sexual behavior, open field activity and body temperature in ovariectomized female rats. *Prostaglandins* 10: 877-888.
- Hamilton BS, Paglia D, Kwan AY y Deitel M. 1995. Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. *Nat Med* 1: 953-956.
- Hansen S, Stanfield EJ y Everitt BJ. 1980. The role of ventral bundle noradrenergic neurones in sensory components of sexual behaviour and coitus-induced pseudopregnancy. *Nature* 286: 152-154.
- 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.
- Harris GW y Michael RP. 1964. The Activation of Sexual Behaviour by Hypothalamic Implants of Oestrogen. *J Physiol* 171: 275-301.
- Hashimoto I, Henricks DM, Anderson LL y Melampy RM. 1968. Progesterone and pregn-4-en-20 alpha-ol-3-one in ovarian venous blood during various reproductive states in the rat. *Endocrinology* 82: 333-341.
- Haynes WG, Sivitz WI, Morgan DA, Walsh SA y Mark AL. 1997. Sympathetic and cardiorenal actions of leptin. *Hypertension* 30: 619-623.
- Heiman ML, Ahima RS, Craft LS, Schoner B, Stephens TW y Flier JS. 1997. Leptin inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to stress.

- Endocrinology 138: 3859-3863.
- 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: 447-448.
- Herrmann W, Wyss R, Riondel A, Philibert D, Teutsch G, Sakiz E y Baulieu EE. 1982. The effects of an antiprogestosterone steroid in women: interruption of the menstrual cycle and of early pregnancy. *C R Seances Acad Sci III* 294: 933-938.
- Hileman SM, Tornoe J, Flier JS y Bjorbaek C. 2000. Transcellular transport of leptin by the short leptin receptor isoform ObRa in Madin-Darby Canine Kidney cells. *Endocrinology* 141: 1955-1961.
- Hirano K, Ichihashi T y Yamada H. 1982. Studies on the absorption of practically water-insoluble drugs following injection V: Subcutaneous absorption in rats from solutions in water immiscible oils. *J Pharm Sci* 71: 495-500.
- Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, Williams LM, Trayhurn P y Mercer JG. 1997. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 11073-11078.
- Horwitz KB y Alexander PS. 1983. In situ photolinked nuclear progesterone receptor of human breast cancer cells: subunit molecular weights after transformation and translocation. *Endocrinology* 113: 2195-2201.
- Horwitz KB, Jackson TA, Bain DL, Richer JK, Takimoto GS y Tung L. 1996. Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol Endocrinol* 10: 1167-1177.
- Howard JK, Cave BJ, Oksanen LJ, Tzameli I, Bjorbaek C y Flier JS. 2004. Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. *Nat Med* 10: 734-738.
- Hudson R y Vodermayr T. 1992. Spontaneous and odor-induced chin marking in domestic female rabbits. *Anim Behav* 43: 329-336.
- Ichikawa S, Sawada T, Nakamura Y y Morioka H. 1974. Ovarian secretion of pregnane compounds during the estrous cycle and pregnancy in rat. *Endocrinology* 94: 1615-1620.
- Ihle JN y Kerr IM. 1995. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily.

Trends Genet 11: 69-74.

- Imani B, Eijkemans MJ, de Jong FH, Payne NN, Bouchard P, Giudice LC y Fauser BC. 2000. Free androgen index and leptin are the most prominent endocrine predictors of ovarian response during clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligoamenorrhic infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 676-682.
- Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, Gottsch ML, Clifton DK y Steiner RA. 2004. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* 80: 264-272.
- Jackson TA, Richer JK, Bain DL, Takimoto GS, Tung L y Horwitz KB. 1997. The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT. *Mol Endocrinol* 11: 693-705.
- Jensen EV, Suzuki T, Stumpf WE, Jungbut P y DeSombre ER. 1968. A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Biochemistry* 59: 632-638.
- Jung-Testas I, Renoir M, Bugnard H, Greene GL y Baulieu EE. 1992. Demonstration of steroid hormone receptors and steroid action in primary cultures of rat glial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41: 621-631.
- Kamohara S, Burcelin R, Halaas JL, Friedman JM y Charron MJ. 1997. Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* 389: 374-377.
- Kastner P, Bocquel MT, Turcotte B, Garnier JM, Horwitz KB, Chambon P y Gronemeyer H. 1990. Transient expression of human and chicken progesterone receptors does not support alternative translational initiation from a single mRNA as the mechanism generating two receptor isoforms. *J Biol Chem* 265: 12163-12167.
- Kato J y Onouchi T. 1979. Nuclear progesterone receptors and characterization of cytosol receptors in the rat hypothalamus and anterior hypophysis. *J Steroid Biochem* 11: 845-854.
- Kato J y Onouchi T. 1977. Specific progesterone receptors in the hypothalamus and anterior hypophysis of the rat. *Endocrinology* 101: 902-908.
- Kauffman AS, Park JH, McPhie-Lalmansingh AA, Gottsch ML, Bodo C, Hohmann JG,

- Pavlova MN, Rohde AD, Clifton DK, Steiner RA y Rissman EF. 2007. The kisspeptin receptor GPR54 is required for sexual differentiation of the brain and behavior. *J Neurosci* 27: 8826-8835.
- Kauffman AS y Rissman EF. 2004. A critical role for the evolutionarily conserved gonadotropin-releasing hormone II: mediation of energy status and female sexual behavior. *Endocrinology* 145: 3639-3646.
- Kaufman LS, McEwen BS y Pfaff DW. 1988. Cholinergic mechanisms of lordotic behavior in rats. *Physiol Behav* 43: 507-514.
- Kincl FP. 1964. Copulatory Reflex Response to Steroids. En: *Methods in Hormone Research* Dorfman RI (eds.) Editorial. Academic Press. New York and London. pp. 477-484.
- Kinoshita M, Tsukamura H, Adachi S, Matsui H, Uenoyama Y, Iwata K, Yamada S, Inoue K, Ohtaki T, Matsumoto H y Maeda K. 2005. Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology* 146: 4431-4436.
- Kline AD, Becker GW, Churgay LM, Landen BE, Martin DK, Muth WL, Rathnachalam R, Richardson JM, Schoner B, Ulmer M y Hale JE. 1997. Leptin is a four-helix bundle: secondary structure by NMR. *FEBS Lett* 407: 239-242.
- Kloek C, Haq AK, Dunn SL, Lavery HJ, Banks AS y Myers MG, Jr. 2002. Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences. *J Biol Chem* 277: 41547-41555.
- Knuth UA y Friesen HG. 1983. Starvation induced anoestrus: effect of chronic food restriction on body weight, its influence on oestrous cycle and gonadotrophin secretion in rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 104: 402-409.
- Komisaruk BR, Adler NT y Hutchison J. 1972. Genital sensory field: enlargement by estrogen treatment in female rats. *Science* 178: 1295-1298.
- Komisaruk BR y Diakow C. 1973. Lordosis reflex intensity in rats in relation to the estrous cycle, ovariectomy, estrogen administration and mating behavior. *Endocrinology* 93: 548-557.
- Kow LM, Malsbury CW y Pfaff DW. 1974. Effects of progesterone on female reproductive behavior in rats: possible modes of action and role in behavioral sex differences. *Adv Behav Biol* 11: 179-210.

- Kow LM, Montgomery MO y Pfaff DW. 1977. Effects of spinal cord transections on lordosis reflex in female rats. *Brain Res* 123: 75-88.
- Kow LM, Montgomery MO y Pfaff DW. 1979. Triggering of lordosis reflex in female rats with somatosensory stimulation: quantitative determination of stimulus parameters. *J Neurophysiol* 42: 195-202.
- Kubli-Garfias C y Whalen RE. 1977. Induction of lordosis behavior in female rats by intravenous administration of progestins. *Horm Behav* 9: 380-386.
- Kuehn RE y Beach FA. 1963. Quantitative measurement of sexual receptivity in female rats. *Behaviour* 21: 282-299.
- Kuhnel B, el-Ashry D, Edwards DP y Nordeen SK. 1989. Mapping contacts between unpurified human progesterone receptor and the hormone response element of mouse mammary tumor virus. *DNA* 8: 703-713.
- Labombarda F, Guennoun R, González S, Roig P, Lima A, Schumacher M y De Nicola AF. 2000. Immunocytochemical evidence for a progesterone receptor in neurons and glial cells of the rat spinal cord. *Neurosci Lett* 288: 29-32.
- Labriola L, Salatino M, Proietti CJ, Pecci A, Coso OA, Kornblihtt AR, Charreau EH y Elizalde PV. 2003. Heregulin induces transcriptional activation of the progesterone receptor by a mechanism that requires functional ErbB-2 and mitogen-activated protein kinase activation in breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 23: 1095-1111.
- Lange CA. 2008. Integration of progesterone receptor action with rapid signaling events in breast cancer models. *J Steroid Biochem Mol Biol* 108: 203-212.
- 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, Gioeli D, Hammes SR y Marker PC. 2007. Integration of rapid signaling events with steroid hormone receptor action in breast and prostate cancer. *Annu Rev Physiol* 69: 171-199.
- Larner JM, Reel JR y Blye RP. 2000. Circulating concentrations of the antiprogestins CDB-2914 and mifepristone in the female rhesus monkey following various routes of administration. *Hum Reprod* 15: 1100-1106.

- Latimer VS, Rodrigues SM, Garyfallou VT, Kohama SG, White RB, Fernald RD y Urbanski HF. 2000. Two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone (GnRH-I and GnRH-II) are expressed by two separate populations of cells in the rhesus macaque hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res* 75: 287-292.
- Law T y Meagher W. 1958. Hypothalamic lesions and sexual behavior in the female rats. *Science* 128: 1626-1627.
- Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI y Friedman JM. 1996. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379: 632-635.
- Lehman MN, Robinson JE, Karsch FJ y Silverman AJ. 1986. Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) pathways in the sheep brain during anestrus and the mid-luteal phase of the estrous cycle. *J Comp Neurol* 244: 19-35.
- Leung PC y Wang J. 1989. Inositol lipids and LHRH action in the rat ovary. *J Reprod Fertil Suppl* 37: 287-293.
- Leyes y Códigos de México. 1995. Reglamentación de la Ley General de Salud en relación con la Investigación en Salud, 12ava Edición. Editorial Porrúa. México.
- Licinio J, Mantzoros C, Negrao AB, Cizza G, Wong ML, Bongiorno PB, Chrousos GP, Karp B, Allen C, Flier JS y Gold PW. 1997. Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. *Nat Med* 3: 575-579.
- Lisk RD. 1960. A comparison of the effectiveness of intravenous, as opposed to subcutaneous, injection of progesterone for the induction of estrous behavior in the rat. *Can J Biochem Physiol* 38: 1381-1383.
- Lollmann B, Gruninger S, Stricker-Krongrad A y Chiesi M. 1997. Detection and quantification of the leptin receptor splice variants Ob-Ra, b, and, e in different mouse tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 238: 648-652.
- Long JA y Evans HM. 1922. The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Mem Univ Calif* 6: 1-148.
- Lonnqvist F, Arner P, Nordfors L y Schalling M. 1995. Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects. *Nat Med* 1: 950-953.
- MacLusky MJ y McEwen BS. 1978. Oestrogen modulates progesterone receptor

- concentrations in some rat brain regions but not in others. *Nature* 274: 276-278.
- Machinal F, Dieudonne MN, Leneuve MC, Pecquery R y Giudicelli Y. 1999. In vivo and in vitro ob gene expression and leptin secretion in rat adipocytes: evidence for a regional specific regulation by sex steroid hormones. *Endocrinology* 140: 1567-1574.
- Madej T, Boguski MS y Bryant SH. 1995. Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine. *FEBS Lett* 373: 13-18.
- Maffei MJ, Halaas J y Ravussin E. 1995. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob mRNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1: 1155-1156.
- Magni P, Vettor R, Pagano C, Calcagno A, Beretta E, Messi E, Zanisi M, Martini L y Motta M. 1999. Expression of a leptin receptor in immortalized gonadotropin-releasing hormone-secreting neurons. *Endocrinology* 140: 1581-1585.
- 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.
- Mandl AM. 1951. The phases of estrous cycle in the adult white rat. *J Exp Biol* 28: 576-584.
- Mani S y Portillo W. 2010. Activation of progestin receptors in female reproductive behavior: Interactions with neurotransmitters. *Front Neuroendocrinol* 31: 157-171.
- Mani SK, Allen JM, Clark JH, Blaustein JD y O'Malley BW. 1994a. Convergent pathways for steroid hormone- and neurotransmitter-induced rat sexual behavior. *Science* 265: 1246-1249.
- Mani SK, Blaustein JD, Allen JM, Law SW, O'Malley BW y Clark JH. 1994b. Inhibition of rat sexual behavior by antisense oligonucleotides to the progesterone receptor. *Endocrinology* 135: 1409-1414.
- Mann DR y Plant TM. 2002. Leptin and pubertal development. *Semin Reprod Med* 20: 93-102.
- Mantzoros CS. 2000. Role of leptin in reproduction. *Ann N Y Acad Sci* 900: 174-183.

- Mantzoros CS, Dunaif A y Flier JS. 1997. Leptin concentrations in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 1687-1691.
- Marrone BL, Rodriguez-Sierra JF y Feder HH. 1979. Intrahypothalamic implants of progesterone inhibit lordosis behavior in ovariectomized, estrogen-treated rats. *Neuroendocrinology* 28: 92-102.
- Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T y Nakao K. 1997. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 3: 1029-1033.
- Matsuo H, Baba Y, Nair RM, Arimura A y Schally AV. 1971. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 43: 1334-1339.
- McCarthy MM, Masters DB, Fiber JM, Lopez-Colome AM, Beyer C, Komisaruk BR y Feder HH. 1991. GABAergic control of receptivity in the female rat. *Neuroendocrinology* 53: 473-479.
- McDonnell DP. 1995. Unravelling the human progesterone receptor signal transduction pathway: insights into antiprogestin action. *Trends Endocrinol Metab* 6: 133-138.
- McEwen BS, Krey LC y Luine VN. 1978. Steroid hormone action in the neuroendocrine system: when is the genome involved? *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 56: 255-268.
- 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.
- McGinnis MY, Parsons B, Rainbow TC, Krey LC y McEwen BS. 1981. Temporal relationship between cell nuclear progestin receptor levels and sexual receptivity following intravenous progesterone administration. *Brain Res* 218: 365-371.
- McLusky NJM, B.S. 1980. Progestin receptors in rat brain: distribution and properties of cytoplasmic progestin-binding sites. *Endocrinology* 106: 192-202.
- Meisel RL y Pfaff DW. 1985. Specificity and neural sites of action of anisomycin in the reduction or facilitation of female sexual behavior in rats. *Horm Behav* 19: 237-251.
- Mendelson SD y McEwen BS. 1992. Autoradiographic analyses of the effects of

- adrenalectomy and corticosterone on 5-HT1A and 5-HT1B receptors in the dorsal hippocampus and cortex of the rat. *Neuroendocrinology* 55: 444-450.
- Mercer LD, Beart PM, Horne MK, Finkelstein DI, Carrive P y Paxinos G. 1996. On the distribution of cholecystokinin B receptors in monkey brain. *Brain Res* 738: 313-318.
- Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MB, Colledge WH, Caraty A y Aparicio SA. 2005. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 1761-1766.
- Messinis IE, Kariotis I, Milingos S, Kollios G y Seferiadis K. 2000. Treatment of normal women with oestradiol plus progesterone prevents the decrease of leptin concentrations induced by ovariectomy. *Hum Reprod* 15: 2383-2387.
- Meston CM, Moe IV y Gorzalka BB. 1996. Effects of sympathetic inhibition on receptive, proceptive, and rejection behaviors in the female rat. *Physiol Behav* 59: 537-542.
- Meyer ME, Pornon A, Ji JW, Bocquel MT, Chambon P y Gronemeyer H. 1990. Agonistic and antagonistic activities of RU486 on the functions of the human progesterone receptor. *EMBO J* 9: 3923-3932.
- Millar RP. 2005. GnRHs and GnRH receptors. *Anim Reprod Sci* 88: 5-28.
- Millhouse OE. 1973. The organization of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Brain Res* 55: 71-87.
- Misrahi M, Atger M, d'Auriol L, Loosfelt H, Meriel C, Fridlansky F, Guiochon-Mantel A, Galibert F y Milgrom E. 1987. Complete amino acid sequence of the human progesterone receptor deduced from cloned cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 143: 740-748.
- Miyamoto K, Hasegawa Y, Minegishi T, Nomura M, Takahashi Y, Igarashi M, Kangawa K y Matsuo H. 1982. Isolation and characterization of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 107: 820-827.
- Mobbs BG y Liu Y. 1990. Immunohistochemical localization of progesterone receptor in benign and malignant human prostate. *Prostate* 16: 245-251.
- 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.
- Modianos DT y Pfaff DW. 1976. Brain stem and cerebellar lesions in female rats. I. Tests of posture and movement. *Brain Res* 106: 31-46.
- Moguilewsky M y Philibert D. 1984. RU 38486: potent antiglucocorticoid activity correlated with strong binding to the cytosolic glucocorticoid receptor followed by an impaired activation. *J Steroid Biochem* 20: 271-276.
- Moguilewsky M y Raynaud JP. 1977. Progesterin binding sites in the rat hypothalamus pituitary and uterus. *Steroids* 30: 99-109.
- 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.
- Moralí G y Beyer C. 1979. Neuroendocrine Control of Mammalian Estrous Behavior. En: *Endocrine Control of Sexual Behavior*. Beyer C (eds.) Editorial. Raven Press. New York. pp. 33-75.
- Moreines J y Powers JB. 1977. Effects of acute ovariectomy on the lordosis response of female rats. *Physiol Behav* 9: 277-283.
- Mori H, Hanada R, Hanada T, Aki D, Mashima R, Nishinakamura H, Torisu T, Chien KR, Yasukawa H y Yoshimura A. 2004. Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity. *Nat Med* 10: 739-743.
- Morin LP y Feder HH. 1974a. Hypothalamic progesterone implants and facilitation of lordosis behavior in estrogen-primed ovariectomized guinea pigs. *Brain Res* 70: 81-93.
- Morin LP y Feder HH. 1974b. Inhibition of lordosis behavior in ovariectomized guinea pigs by mesencephalic implants of progesterone. *Brain Res* 70: 71-80.
- Morrell JI, Krieger MS y Pfaff DW. 1986. Quantitative autoradiographic analysis of estradiol retention by cells in the preoptic area, hypothalamus and amygdala. *Exp Brain Res* 62: 343-354.
- 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. 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.
- Moss RL y McCann SM. 1973. Induction of mating behavior in rats by luteinizing hormone-releasing factor. *Science* 181: 177-179.
- Moss RL, Paloutzian RF y Law OT. 1974. Electrical stimulation of forebrain structures and its effect on copulatory as well as stimulus-bound behavior in ovariectomized hormone-primed rats. *Physiol Behav* 12: 997-1004.
- Mueller AL, Taube JS y Schwartzkroin PA. 1984. Development of hyperpolarizing inhibitory postsynaptic potentials and hyperpolarizing response to gamma-aminobutyric acid in rabbit hippocampus studied in vitro. *J Neurosci* 4: 860-867.
- Mulac-Jericevic B y Conneely OM. 2004. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction* 128: 139-146.
- Mulac-Jericevic B, Mullinax RA, DeMayo FJ, Lydon JP y Conneely OM. 2000. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* 289: 1751-1754.
- Muller P, Kutenkeuler D, Gesellchen V, Zeidler MP y Boutros M. 2005. Identification of JAK/STAT signalling components by genome-wide RNA interference. *Nature* 436: 871-875.
- Munzberg H y Myers MG, Jr. 2005. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci* 8: 566-570.
- Murakami M, Narazaki M, Hibi M, Yawata H, Yasukawa K, Hamaguchi M, Taga T y Kishimoto T. 1991. Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 11349-11353.
- Murakami T, Iida M y Shima K. 1995. Dexamethasone regulates obese expression in isolated rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 214: 1260-1267.
- Myers J, M.G. 2004. Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *Rec Prog Horm Res* 59: 287-304.

- Nance DM, Shryne J y Gorski RA. 1974. Septal lesions: effects on lordosis behavior and pattern of gonadotropin release. *Horm Behav* 5: 73-81.
- Nance DM, Shryne J y Gorski RA. 1975. Effects of septal lesions on behavioral sensitivity of female rats to gonadal hormones. *Horm Behav* 6: 59-64.
- Napoli A, Powers JB y Valenstein ES. 1972. Hormonal induction of behavioral estrus modified by electrical stimulation of hypothalamus. *Physiol Behav* 9: 115-117.
- O'Malley BW, Tsai SY, Bagchi M, Weigel NL, Schrader WT y Tsai MJ. 1991. Molecular mechanism of action of a steroid hormone receptor. *Rec Prog Horm Res* 47: 1-26.
- 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.
- Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ y O'Malley BW. 1995. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270: 1354-1357.
- Pan JT y Gala RR. 1988. The serotonin 5-HT₂ receptor system, but not the alpha 1-adrenergic receptor system, is involved in the estrogen-induced afternoon prolactin surge in the rat. *Life Sci* 42: 1869-1874.
- Pan JT, Kow LM, Kendall DA, Kaiser ET y Pfaff DW. 1986. Electrophysiological test of an amphiphilic beta-structure in LHRH action. *Mol Cell Endocrinol* 48: 161-166.
- Pan JT, Kow LM y Pfaff DW. 1988. Modulatory actions of luteinizing hormone-releasing hormone on electrical activity of preoptic neurons in brain slices. *Neuroscience* 27: 623-628.
- Parsons B, McEwen BS y Pfaff DW. 1982. A discontinuous schedule of estradiol treatment is sufficient to activate progesterone-facilitated feminine sexual behavior and to increase cytosol receptors for progestins in the hypothalamus of the rat. *Endocrinology* 110: 613-619.
- Paxinos G y Watson C. 2006. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Editorial Academic Press. Australia.
- Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T y Collins F. 1995. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269: 540-543.
- Perrot-Applanat M, Groyer-Picard MT, Logeat F y Milgrom E. 1986. Ultrastructural

- localization of the progesterone receptor by an immunogold method: effect of hormone administration. *J Cell Biol* 102: 1191-1199.
- Pfaff DW. 1973. Luteinizing hormone-releasing factor potentiates lordosis behavior in hypophysectomized ovariectomized female rats. *Science* 182: 1148-1149.
- Pfaff DW y Sakuma Y. 1979. Deficit in the lordosis reflex of female rats caused by lesions in the 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 y Sakuma Y. 1980. *Estrogens and Brain Function*. Editorial Springer-Verlag. New York.
- Philibert D, Ojasoo T y Raynaud JP. 1977. Properties of cytoplasmic progestin binding protein in the rabbit uterus. *Endocrinol* 101: 1850-1861.
- Philibert D y Raynaud JP. 1973. Progesterone binding in the immature mouse and rat uterus. *Steroids* 22: 89-98.
- Pleim ET y Barfield RJ. 1988. Progesterone versus estrogen facilitation of female sexual behavior by intracranial administration to female rats. *Horm Behav* 22: 150-159.
- Pleim ET y DeBold JF. 1984. The relative effectiveness of progestins for facilitation and inhibition of sexual receptivity in hamsters. *Physiol Behav* 32: 743-747.
- Poletti A, Conneely OM, McDonnell DP, Schrader WT, O'Malley BW y Weigel NL. 1993. Chicken progesterone receptor expressed in *Saccharomyces cerevisiae* is correctly phosphorylated at all four Ser-Pro phosphorylation sites. *Biochemistry* 32: 9563-9569.
- Pollio G, Xue P, Zanisi M, Nicolini 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.
- Powers JB. 1972. Facilitation of lordosis in ovariectomized rats by intracerebral progesterone implants. *Brain Res* 48: 311-325.
- Powers JB y Valenstein ES. 1972. Sexual receptivity: Facilitation by medial preoptic lesions in female rats. *Science* 175: 103-105.

- Pratt WB, Hutchison KA y Scherrer LC. 1992. Steroid receptor folding by heat-shock proteins and composition of the receptor heterocomplex. *Trends Endocrinol Metab* 3: 326-333.
- 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.
- Quennell JH, Mulligan AC, Tups A, Liu X, Phipps SJ, Kemp CJ, Herbison AE, Grattan DR y Anderson GM. 2009. Leptin indirectly regulates gonadotropin-releasing hormone neuronal function. *Endocrinology* 150: 2805-2812.
- Qureshi GA y Eriksson A. 1988. Determination of clenbuterol and mabuterol in equine plasma by ion-pair liquid chromatography with electrochemical detection. Chromatographic and electrochemical characteristics. *J Chromatogr* 441: 197-205.
- Raible LH y Gorzalka BB. 1986. Short and long term inhibitory actions of alpha-melanocyte stimulating hormone on lordosis in rats. *Peptides* 7: 581-586.
- 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.
- Rauch M, Loosfelt H, Philibert D y Milgrom E. 1985. Mechanism of action of an antiprogestone, RU486, in the rabbit endometrium. Effects of RU486 on the progesterone receptor and on the expression of the uteroglobin gene. *Eur J Biochem* 148: 213-218.
- Riad-Gabriel MG, Jinagouda SD, Sharma A, Boyadjian R y Saad MF. 1998. Changes in plasma leptin during the menstrual cycle. *Eur J Endocrinol* 139: 528-531.
- Riskind P y Moss RL. 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.
- 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.
- 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 5 β , 3 β -pregnanolone: a ring A reduced progesterone metabolite. *Physiol Behav* 36: 277-281.
- Rodríguez-Sierra JF y Komisaruk BR. 1982. Common hypothalamic sites for activation of sexual receptivity in female rats by LHRH, PGE₂ and progesterone. *Neuroendocrinology* 35: 363-369.
- 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.
- Rosenbaum M y Leibel RL. 1999. The role of leptin in human physiology. *N Engl J Med* 341: 913-915.
- Ross J, Claybaugh C, Clemens LG y Gorski RA. 1971. Short latency induction of estrous behavior with intracerebral gonadal hormones in overiectomized rats. *Endocrinology* 89: 32-38.
- Rowan BG, Narayanan R y Weigel NL. 2003. Analysis of receptor phosphorylation. *Methods Enzymol* 364: 173-202.
- Rowan BG y O'Malley BW. 2000. Progesterone receptor coactivators. *Steroids* 65: 545-549.
- Rubin BS y Barfield RJ. 1980. Priming of estrous responsiveness by implants of 17 beta-estradiol in the ventromedial hypothalamic nucleus of female rats. *Endocrinology* 106: 504-509.
- Rubin BS y Barfield RJ. 1983a. Induction of estrous behavior in ovariectomized rats by sequential replacement of estrogen and progesterone to the ventromedial hypothalamus. *Neuroendocrinology* 37: 218-224.
- Rubin BS y Barfield RJ. 1983b. Progesterone in the ventromedial hypothalamus facilitates estrous behavior in ovariectomized, estrogen-primed rats. *Endocrinology* 113: 797-804.
- Sahu A. 2004. Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Front Neuroendocrinol* 24: 225-253.
- Sakamaki K, Nomura M, Yamato K y Tanaka J. 2004. GABA-mediated attenuation of

- noradrenaline release in the rat median preoptic area caused by intravenous injection of metaraminol. *Auton Neurosci* 111: 7-14.
- Sakuma Y y Pfaff DW. 1979a. Facilitation of female reproductive behavior from mesencephalic central gray in the rat. *Am J Physiol* 237: 278-284.
- Sakuma Y y Pfaff DW. 1979b. Mesencephalic mechanisms for integration of female reproductive behavior in the rat. *Am J Physiol* 237: R285-290.
- Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B y Auwerx J. 1995. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 377: 527-529.
- Samson WK, McCann SM, Chud L, Dudley CA y Moss RL. 1980. Intra- and extrahypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) distribution in the rat with special reference to mesencephalic sites which contain both LHRH and single neurons responsive to LHRH. *Neuroendocrinology* 31: 66-72.
- Sawyer CH. 1959. Effects of brain lesions on estrous behavior and reflexogenous ovulation in the rabbit. *J Exp Zool* 142: 227-246.
- Schally AV, Nair RM, Redding TW y Arimura A. 1971. Isolation of the luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone-releasing hormone from porcine hypothalami. *J Biol Chem* 246: 7230-7236.
- Schally AV y Varga JL. 1999. Antagonistic Analogs of Growth Hormone-releasing Hormone: New Potential Antitumor Agents. *Trends Endocrinol Metab* 10: 383-391.
- Schneider JE, Goldman MD, Tang S, Bean B, Ji H y Friedman MI. 1998. Leptin indirectly affects estrous cycles by increasing metabolic fuel oxidation. *Horm Behav* 33: 217-228.
- Schreiner L y Kling A. 1953. Behavioral changes following rhinencephalic injury in cat. *J Neurophysiol* 16: 643-659.
- Schumacher M, Coirini H, Pfaff DW y McEwen BS. 1990. Behavioral effects of progesterone associated with rapid modulation of oxytocin receptors. *Science* 250: 691-694.
- Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P y Baskin DG. 1996. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 98: 1101-1106.
- Shughrue PJ, Lane MV y Merchenthaler I. 1997. Regulation of progesterone receptor

- messenger ribonucleic acid in the rat medial preoptic nucleus by estrogenic and antiestrogenic compounds: an in situ hybridization study. *Endocrinology* 138: 5476-5484.
- Shimizu H, Shimomura Y, Hayashi R, Ohtani K, Sato N, Futawatari T y Mori M. 1997. Serum leptin concentration is associated with total body fat mass, but not abdominal fat distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord* 21: 536-541.
- Siegel S y Castellan NJ. 1995. *Estadística no Paramétrica Aplicada a las Ciencias de la Conducta*. Editorial Trillas. México.
- Siegrist-Kaiser CA, Pauli V, Juge-Aubry CE, Boss O, Pernin A, Chin WW, Cusin I, Rohner-Jeanrenaud F, Burger AG, Zapf J y Meier CA. 1997. Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue. *J Clin Invest* 100: 2858-2864.
- Simonian SX, Spratt DP y Herbison AE. 1999. Identification and characterization of estrogen receptor alpha-containing neurons projecting to the vicinity of the gonadotropin-releasing hormone perikarya in the rostral preoptic area of the rat. *J Comp Neurol* 411: 346-358.
- Singer JJ. 1968. Hypothalamic control of male and female sexual behavior in female rat. *J Com Physiol Psychol* 66: 738-742.
- Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, Kolaczynski JW, Heiman ML, Hale J, Becker GW, Bowsher RR, Stephens TW y Caro JF. 1996. Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. *J Clin Invest* 98: 1277-1282.
- Skafar DF. 1991. Differences in the binding mechanism of RU486 and progesterone to the progesterone receptor. *Biochemistry* 30: 10829-10832.
- Smith DF, Faber LE y Toft DO. 1990. Purification of unactivated progesterone receptor and identification of novel receptor-associated proteins. *J Biol Chem* 265: 3996-4003.
- Smith JT, Acohido BV, Clifton DK y Steiner RA. 2006. KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol* 18: 298-303.
- Steppan CM y Swick AG. 1999. A role for leptin in brain development. *Biochem Biophys Res Commun* 256: 600-602.
- Sweeney G. 2002. Leptin signalling. *Cell Signal* 14: 655-663.

- Takahashi LK y Lisk RD. 1985. Diencephalic sites of progesterone action for inhibiting aggression and facilitating sexual receptivity in estrogen-primed golden hamsters. *Endocrinology* 116: 2393-2399.
- Takahashi LK y Lisk RD. 1986. Intracranial sites regulating the biphasic action of progesterone in estrogen-primed golden hamsters. *Endocrinology* 119: 2744-2754.
- Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA y Tepper RI. 1995. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83: 1263-1271.
- Tennent BJ, Smith ER y Davidson JM. 1982. Effects of progesterone implants in the habenula and midbrain on proceptive and receptive behavior in the female rat. *Horm Behav* 16: 352-363.
- Tetel MJ, Giangrande PH, Leonhardt SA, McDonnell DP y Edwards DP. 1999. Hormone-dependent interaction between the amino- and carboxyl -terminal domains of progesterone receptor in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol* 13: 910-924.
- Turcotte JC y Blaustein JD. 1993. Immunocytochemical localization of midbrain estrogen receptor- and progestin receptor-containing cells in female guinea pigs. *J Comp Neurol* 328: 76-87.
- Ulloa-Aguirre A, Stanislaus D, Arora V, Vaananen J, Brothers S, Janovick JA y Conn PM. 1998. The third intracellular loop of the rat gonadotropin-releasing hormone receptor couples the receptor to Gs- and G(q/11)-mediated signal transduction pathways: evidence from loop fragment transfection in GGH3 cells. *Endocrinology* 139: 2472-2478.
- Vathy IU, Etgen AM y Barfield RJ. 1987. Actions of progestins on estrous behaviour in female rats. *Physiol Behav* 40: 591-595.
- Vegeto E, Allan GF, Schrader WT, Tsai MJ, McDonnell DP y O'Malley BW. 1992. The mechanism of RU486 antagonism is dependent on the conformation of the carboxy-terminal tail of the human progesterone receptor. *Cell* 69: 703-713.
- Vogel G. 1996. Leptin: a trigger for puberty?. *Science* 274: 1466-1467.
- Wade GN, Lempicki RL, Panicker AK, Frisbee RM y Blaustein JD. 1997. Leptin facilitates

- and inhibits sexual behavior in female hamsters. *Am J Physiol* 272: R1354-1358.
- Wang J, Lee V y Leung PC. 1989. Differential role of protein kinase C in the action of luteinizing hormone-releasing hormone on hormone production in rat ovarian cells. *Am J Obstet Gynecol* 160: 984-989.
- Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N y Rossetti L. 1998a. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 393: 684-688.
- Wang M-Y, Zhou YT, Newgard CB y Unger RH. 1998b. A novel leptin receptor isoform in rat. *FEBS Lett* 392: 87-90.
- Warembourg M, Jolivet A y Milgrom E. 1989. Immunohistochemical evidence of the presence of the estrogen and progesterone receptors in the same neurons of the guinea pig hypothalamus and preoptic area. *Brain Res* 20: 1-15.
- Warembourg M. 1985. Steroid receptors in the brain: Topography and some functional implications. *Neurochem Int* 7: 941-952.
- Watanobe H. 2002. Leptin directly acts within the hypothalamus to stimulate gonadotropin-releasing hormone secretion in vivo in rats. *J Physiol* 545: 255-268.
- Wei LL, González-Aller C, Wood WM, Miller LA y Horwitz KB. 1990. 5'-Heterogeneity in human progesterone receptor transcripts predicts a new amino-terminal truncated "C"-receptor and unique A-receptor messages. *Mol Endocrinol* 4: 1833-1840.
- Wei LL, Hawkins P, Baker C, Norris B, Sheridan PL y Quinn PG. 1996. An amino terminal truncated progesterone receptor isoform, PRC, enhances progestin induced transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 10: 1379-1387.
- Weigel NL, Bai W, Zhang Y, Beck CA, Edwards DP y Poletti A. 1995. Phosphorylation and progesterone receptor function. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53: 509-514.
- Whalen RE y Gorzalka BB. 1972. The effects of progesterone and its metabolites on the induction of sexual receptivity in rats. *Horm Behav* 3: 221-226.
- Wheaton JE, Krulich L y McCann SM. 1975. Localization of luteinizing hormone-releasing hormone in the preoptic area and hypothalamus of the rat using radioimmunoassay. *Endocrinology* 97: 30-38.
- Wilcox JN, Barclay SR y Feder HH. 1984. Administration of estradiol-17 beta in pulses to female guinea pigs: self-priming effects of estrogen on brain tissues mediating

- lordosis. *Physiol Behav* 32: 483-488.
- Wilson CA y Endersby CA. 1979. The stimulatory effect of 5HT and the role of the paraventricular nucleus on PMS induced ovulation in the immature rat. *Neuroendocrinology* 28: 415-424.
- Wilson CA y Hunter AJ. 1985. Progesterone stimulates sexual behaviour in female rats by increasing 5-HT activity on 5-HT₂ receptors. *Brain Res* 333: 223-229.
- Yanase M y Gorski RA. 1976. Sites of estrogen and progesterone facilitation of lordosis behavior in the spayed rat. *Biol Reprod* 37: 597-602.
- Yoneda N, Saito S, Kimura M, Yamada M, Iida M, Murakami T, Irahara M, Shima K y Aono T. 1998. The influence of ovariectomy on ob gene expression in rats. *Horm Metab Res* 30: 263-265.
- Yu WH. 1997. Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1023-1028.
- Zadina JE, Kastin AJ, Fabre LA y Coy DH. 1981. Facilitation of sexual receptivity in the rat by an ovulation-inhibiting analog of LHRH. *Pharmacol Biochem Behav* 15: 961-964.
- Zasorin NL. 1975. Suppression of lordosis in the hormone-primed female hamster by electrical stimulation of the septal area. *Physiol Behav* 14: 595-593.
- Zemlan FP y Adler NT. 1977. Hormonal control of female sexual behavior in the rat. *Horm Behav* 9: 345-357.
- Zemlan FP, Kow LM, Morrell JI y Pfaff DW. 1979. Descending tracts of the lateral columns of the rat spinal cord: a study using the horseradish peroxidase and silver impregnation techniques. *J Anat* 128: 489-512.
- Zhang Y, Beck CA, Poletti A, Clement JPt, Pendergrast P, Yip TT, Hutchens TW, Edwards DP y Weigel NL. 1997. Phosphorylation of human progesterone receptor by cyclin-dependent kinase 2 on three sites that are authentic basal phosphorylation sites in vivo. *Mol Endocrinol* 11: 823-832.
- Zhang Y, Beck CA, Poletti A, Edwards DP y Weigel NL. 1995. Identification of a group of Ser-Pro motif hormone-inducible phosphorylation sites in the human progesterone receptor. *Mol Endocrinol* 9: 1029-1040.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L y Friedman JM. 1994. Positional

cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432.

Zouhar RL y DeGroot J. 1963. Effects of limbic brain lesions on aspects of reproduction in female rats. *Anat Rec* 145: 358-363.

Zucker I y Goy RW. 1967. Sexual receptivity in the guinea pig: inhibitory and facilitatory actions of progesterone and related compounds. *J Comp Physiol Psychol* 64: 378-383.

12. GLOSARIO DE TÉRMINOS

Acido desoxirribonucleico	ADN
Acido gama amino butírico	GABA
Acido ribonucleico	ARN
Acido ribonucleico mensajero	ARNm
Adenosin monofosfato cíclico	AMPc
Adiministracion intravenosa	iv
Administración subcutánea	sc
Aminoacidos	aa
Área preóptica media	APOm
Área tegmental ventral	ATV
Benzoato de estradiol	BE
Caseina cinasa II	CdkII
Cinasa activada por mitógeno	MAPK
Cinasa dependiente de ciclina	CKII
Conducta de estro	CE
Conducta de lordosis	CL
Cuerpo geniculado medio	CGM
Dominios extracelulares	DE
Dominios intracelulares	DI
Dominios transmembranales	TMs
Elementos de respuesta a la progesterona	HRP
Eminencia media	EM
Estradiol	E ₂
Formación reticular medular	FRM
Fosfatidil inositol	PI
Función de activación dependiente del ligando 2	AF-2
Función de activación dependiente del ligando 3	AF-3
Función de transactivación 1	AF-1

Guanosin monofosfato cíclico	GMPc
Hipotálamo anteromedial	HAM
Hipotálamo dorsomedial	HDM
Hipotálamo ventromedial	HVM
Hormona estimulante de los melanocitos	MSH
Hormona folículo estimulante	FSH
Hormona liberadora de gonadotrofinas	GnRH
Hormona luteinizante	LH
Intracerebroventricular	icv
Isoforma A del receptor a progesterona	PR-A
Isoforma B del receptor a progesterona	PR-B
Isoforma C del receptor a progesterona	PR-C
Janus cinasa	JAK
Noradrenalina	NA
Núcleo arqueado	Narc
Núcleo paraventricular	PVN
Núcleo periventricular	PMV
Núcleo ventro medial del hipotálamo	HVM
Núcleo vestibular lateral	NVL
Ovariectomía	OVX
Progesterona	P ₄
Prostaglandina E ₂	PGE ₂
Proteína cinasa A	PKA
Proteína cinasa C	PKC
Proteína cinasa G	PKG
Proteínas de choque térmico	HSPs
Proteínas inactivas inducidas por estrógeno	PIEi
Receptor a progesterona	RP
Receptor de Kisspeptina	GPR54
Receptor de leptina	Ob-R

Receptor GnRH-1	GnRH-1
Receptores a progesterona	RPs
Señales supresoras de citocinas	SOCS
Señales transductoras activadoras de la transcripción	STAT
Sistema nervioso central	SNC
Sustancia gris central mesencefálica	SGCM
Ventrículo lateral derecho	vld

13. PUBLICACIONES

13.1. Artículo publicado



Leptin facilitates lordosis behavior through GnRH-1 and progesterin receptors in estrogen-primed rats

Marcos García-Juárez^{a,c}, Carlos Beyer^a, Alfonso Soto-Sánchez^a, Raymundo Domínguez-Ordoñez^{a,b}, Porfirio Gómora-Arrati^a, Francisco Javier Lima-Hernández^a, José R. Eguibar^c, Anne M. Etgen^d, Oscar González-Flores^{a,*}

^aCentro de Investigación en Reproducción Animal, Universidad Autónoma de Tlaxcala-CINVESTAV, Apdo. 62, Tlaxcala, Mexico

^bMaestría en Ciencias Biológicas-UAT, Tlaxcala, Tlax 90140, Mexico

^cInstituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Apdo. Postal 406, Puebla, Pue. C.P. 72000, Mexico

^dD.P. Purpura Department of Neuroscience F113, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY 10461, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 August 2010

Accepted 7 November 2010

Available online 26 November 2010

Keywords:

Leptin

Lordosis behavior

Proceptive behavior

Rejection behavior

GnRH-1 receptor

Progesterin receptor

Antide

RU486

ABSTRACT

Dose response curves for leptin facilitation of estrous behavior (lordosis and proceptivity) were made by infusing the peptide into the lateral ventricle (icv) of ovariectomized (ovx), *ad libitum*-fed rats injected 40 h previously with 5 µg of estradiol benzoate. Leptin doses of 1 and 3 µg produced significant lordosis quotient at 60 min post-injection, with maximal lordosis being displayed at 120 min. Yet the intensity of lordosis was weak, and a high incidence of rejection behaviors was found. Moreover, leptin did not induce significant proceptive behaviors at any dose. The leptin doses of 1 and 3 µg were selected for determining whether antide, a GnRH-1 receptor antagonist, or the progesterin receptor antagonist RU486 could modify the lordosis response to leptin. Icv injection of either antide or RU486 1 h before leptin significantly depressed leptin facilitation of lordosis. The results suggest that leptin stimulates lordosis by releasing GnRH, which in turn activates GnRH-1 and progesterin receptors. The physiological role of leptin in the control of estrous behavior remains to be determined.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Reproductive behaviors in rodents are stimulated during the estrous cycle by the sequential secretion of ovarian steroids, estradiol (E₂) and progesterone (P). Several other non-steroidal agents have been found to stimulate estrous behavior in estrogen-primed rats (for review; Beyer and González-Mariscal, 1986; Beyer et al., 2003; Mani and Portillo, 2010). Most of them are neurotransmitters (dopamine, noradrenaline (NA), acetylcholine) or neuromodulators (gonadotropin releasing hormone (GnRH), prostaglandins, α -melanocyte hormone, etc.) involved in the transmission of signals in the neural circuits related to the expression of estrous behaviors.

Humoral stimuli originating in the periphery may also modulate estrous behavior (Bloch et al., 1987). For example, leptin, a hormone produced by adipocytes (Campfield et al., 1995; Ahima and Flier, 2000), has been reported to influence estrous behavior

in rodents (Wade et al., 1997; Fox et al., 2000). Thus, leptin facilitated sexual behavior in *ad libitum* fed female hamsters, but not in food-deprived animals. In this latter condition, leptin treatment intensified the inhibition of lordosis induced by fasting (Wade et al., 1997). On the other hand, intracerebral administration of leptin failed to augment the lordosis response induced by E₂ and P and inhibited proceptivity in genetically obese Zucker rats (fa/fa; Fox et al., 2000). These results suggest that leptin has complex effects on the sexual behavior of rodents, either facilitating or inhibiting it, probably depending on the metabolic or nutritional condition of the animals.

To date no studies on leptin modulation of reproductive behaviors have been performed in the *ad libitum* fed rat. Therefore, in an initial experiment we tested the capacity of various dosages of leptin, infused into the lateral ventricle (icv), to stimulate estrous behaviors in ovariectomized (ovx), estrogen-primed rats. The finding that icv leptin significantly facilitated lordosis behavior in ovx, E₂-primed rats led us to explore the possible mechanism mediating this response. Because leptin stimulates GnRH release (Yu et al., 1997; Nagatani et al., 1998; Cunningham et al., 1999; Watanabe, 2002; Quennell et al., 2009), which can facilitate lordosis behavior (Moss and Foreman, 1976; Sakuma and Pfaff, 1980; Beyer et al.,

* Corresponding author. Address: Centro de Investigación en Reproducción Animal, Apartado Postal No. 62, Tlaxcala, Tlax. C.P. 90000, Mexico. Tel./fax: +52 246 46 21727.

E-mail addresses: oglezlo@prodigy.net.mx, oglezlo@hotmail.com (O. González-Flores).

1997), it was plausible that the behavioral effect of leptin was mediated through the release of this peptide. Therefore, in a second experiment we tested the capacity of antide, a GnRH-1 receptor antagonist, to interfere with the facilitatory effects of leptin on lordosis behavior of ova, estrogen-primed rats. Finally, because GnRH enhances lordosis behavior through activation of the progesterin receptor (Beyer et al., 1997), we also tested the capacity of the progesterin receptor antagonist RU486 to block the lordosis behavior induced by leptin.

2. Methods

2.1. Animals

Eighty-seven sexually inexperienced Sprague Dawley female rats bred in our colony were used. Females weighed between 250 and 270 g at the onset of the experiment. They were maintained under controlled temperature (23 ± 2°C) and light conditions (14 h light; 10 h dark; lights off at 1100 h). They were fed Purina rat chow and water *ad libitum*.

2.2. Surgical procedures

All females were ova under ether anesthesia; two weeks later, they were anesthetized with xylozine (4 mg/kg) and ketamine (80 mg/kg) and placed in a Kopf stereotaxic instrument (Tujunga, CA, USA) for implantation of a stainless steel cannula (22 gauge, 17 mm length) into the right lateral ventricle following coordinates from the atlas of Paxinos and Watson (2006) (antero-posterior +0.80 mm, mediolateral 1.5 mm, dorsoventral –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 dummy cannula (30 gauge) provided with a cap was introduced into the guide cannula to prevent clogging and contamination. Immediately after cannula implantation, females were injected with penicillin (22,000 IU/kg).

All procedures used in these experiments followed the Mexican Law for the Protection of Animals and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of CINEVESTAV.

2.3. Testing procedures

Tests for sexual behavior (receptivity and proceptivity) were conducted by placing females in a circular plexiglas arena (53 cm in diameter) with a vigorous male. The lordosis quotient (LQ) = (number of lordosis/10 mounts) × 100 was used to assess receptive behavior. The intensity of lordosis was quantified according to the lordosis score (LS) proposed by Hardy and DeBoid (1972). This scale ranged from 0 to 3 for each individual response and, consequently, from 0 to 30 for each female that received ten mounts from the male. Proceptivity was studied by determining the incidence of hopping, darting, and ear-wiggling across the whole receptivity test (Boach, 1976). We considered an animal proceptive when it showed at least two of these behaviors. We evaluated rejection behavior by determining the incidence of turns, escapes, boxing, kicking and fight (Gorzalía and Gray, 1981). We considered that an animal displayed rejection behavior when it exhibited at least two of these behaviors. In all experiments, the females were tested at 60, 120, and 240 min after leptin injection.

2.4. Chemicals and administration

Leptin (rat recombinant, purity of >97%), E₂ benzoate (EB), the progesterin antagonist RU486 and the GnRH-1 receptor antagonist antide [acetyl-d-Ala(2-naphthyl)-d-Lys(N-nicotinoyl)-d-Lys(N-

nicotinoyl)-Leu-Lys(N-isopropyl)-Pro-d-Ala-NH₂] were purchased from Sigma (St. Louis, Missouri, USA). EB was dissolved in sesame oil to a concentration of 50 µg/ml. Leptin (1 mg) was initially dissolved in 111 µl of Tris (10 mM, pH = 8). From this original concentration (9 µg/µl), dilutions were made to obtain the selected leptin concentrations. Antide was dissolved in saline to a concentration of 1 mg/ml, while RU486 was dissolved in oil/benzyl benzoate/benzilic alcohol (80:15:5) to a concentration of 12.5 mg/ml.

The leptina and antide were infused through a plastic Clay Adams catheter (PE 10 No 7401), fitted to a Hamilton syringe (10 µl) that was inserted into the guide ventricular cannula.

2.5. Experiment 1. Effect of *iv* injections of leptin on estrous behavior of ova, estrogen-primed rats

The objective of this experiment was to characterize the effect of leptin on estrous behavior (lordosis and proceptivity) and to establish a dose response curve for the hormone. Females were primed with 5 µg of EB (sc in 0.1 ml sesame oil) 40 h before leptin or vehicle (Tris 10 mM, pH = 8) injections. In this experiment, leptin was injected *iv* at four dose levels into different animals: 0.33 (n = 8), 1 (n = 8), 3 (n = 8) and 9 µg (n = 9), dissolved in 1 µl of Tris. We used a range of dose similar to that explored by Fox et al. (2000) who found a clear inhibitory response to E₂ and P administration in Zucker obese rats. Control animals (n = 9) were injected with 1 µl of vehicle (Tris).

2.6. Experiment 2. Effect of antide on estrous behavior induced by leptin

This experiment was designed to test whether lordosis behavior induced by leptin is mediated by the activation of the GnRH-1 receptor. Thirty-nine h after EB administration, nineteen female rats received an *iv* injection of 1 µg/µl of antide. One hour later, females received an *iv* injection of either 1 µg/µl (9 animals) or 3 µg/µl (10 animals) of leptin. The dose of antide was selected because it blocked the behavioral effects of GnRH in the study of Kauffman and Rissman (2004).

2.7. Experiment 3. Effect of RU486 on estrous behavior induced by leptin

This experiment was designed to test whether lordosis behavior induced by leptin is mediated through the progesterin receptor. Nineteen estrogen-primed rats were injected *sc* with 5 mg of the antiprogesterin RU486. One hour later, nine females received an *iv* injection of 1 µg and ten rats received 3 µg of leptin. The dose of RU486 was based on previous studies in our laboratory (Beyer et al., 1997).

2.8. Histological confirmation of cannula placement

Twenty-four hours after completion of the experiments, females were anesthetized with ether, and 1% methylene blue was administered through the cannula. Rats were killed by prolonged exposure to the anesthetic. The brain was removed and sectioned in the transverse plane to verify the cannula position in the right lateral ventricle. Data from those animals (n = 7) with the cannula outside the ventricle were discarded from the experiment.

2.9. Statistical analysis

The effect of the GnRH-1 receptor antagonist (antide) and the antiprogesterin RU486 on the behavioral action of leptin was assessed by comparing the LQs obtained with this peptide alone vs those obtained when antide and RU486 were added. Because the

distribution of LQ values in some groups were not normal, a Wilcoxon Mann–Whitney test was used to compare two independent groups (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 (Siegel and Castellan, 1995). Fisher's exact probability test was used to compare the proportion of proceptive females or females showing rejection behaviors among experimental groups.

3. Results

3.1. ICV injections of leptin facilitate lordosis behavior in ovx, estrogen-primed rats

Fig. 1 shows the LQ (panel A), LS (panel B), and the proportions of females displaying proceptivity (panel C) or rejection behaviors (panel D) of EB-primed rats at 60, 120 and 240 min following the icv infusion of the four doses of leptin. The control animals infused with vehicle showed low levels of lordosis and did not display proceptive behaviors. Rejection behavior was observed in only two control rats. Leptin-injected females showed significant, dose-dependent lordosis behavior at all three time intervals tested. A clear dose response relationship was observed between the 0.3 and 3 μ g dose levels at 60 and 120 ($p < 0.05$ and 0.01, respectively) min. The highest receptivity (LQ and LS) was observed in rats receiving 3 μ g of leptin, and the highest dose (9 μ g) evoked a slightly lower response than 3 μ g of leptin. As shown in Fig. 1B, the LS in leptin-infused females was low even at the higher dose levels (3 and 9 μ g). Similarly, a very low proportion of rats displayed proceptive behaviors following leptin administration, and the response was not dose related (Fig. 1C). By contrast, rejection behavior was clearly stimulated by leptin administration at the 1 and 9 μ g doses (Fig. 1D) at 60 and 120 min, with the largest response observed 60 min after infusion of 1 μ g of leptin.

3.2. Effect of antide on estrous behaviors induced by leptin

As shown in Fig. 2, administration of 1 μ g of antide significantly prevented the stimulatory effect of 1 μ g ($p < 0.01$ at 60 and 120 min) or 3 μ g ($p < 0.01$ at 60 and 120 min; $p < 0.05$ at 240 min) of leptin on lordosis behavior in estrogen-primed rats. Moreover, antide also significantly reduced the expression of rejection behaviors in that only one antide-treated female displayed these behaviors.

3.3. Effect of RU486 on lordosis behavior induced by leptin

Fig. 3 shows lordosis behavior induced by the icv administration of 1 (panel A) and 3 μ g (panel B) of leptin. Administration of RU486 significantly decreased the LQ induced by 1 and 3 μ g of leptin at 60 and 120 min. The effect was transitory because at 240 min after leptin administration, no significant differences were observed between females receiving only leptin and those receiving both leptin and RU486. RU486 also significantly decreased both lordosis score and the percentage of females showing rejection behavior.

4. Discussion

The present study shows that icv infusion of leptin elicits significant, although weak lordosis behavior in ovx, EB-primed rats under ad libitum-fed conditions. This result agrees with data obtained in ad libitum fed hamsters by Wade et al. (1997). Leptin failed to elicit full estrous behavior in estrogen-primed rats; proceptivity was absent in most rats receiving the hormone, and rejection behaviors were frequently observed. This finding is consistent with the report that icv leptin inhibits proceptivity in Zucker obese rats treated with EB and P (Fox et al., 2000). This paradoxical feature of leptin, facilitating lordosis and inhibiting proceptivity, suggests that the hormone can directly or indirectly dissociate neural mech-

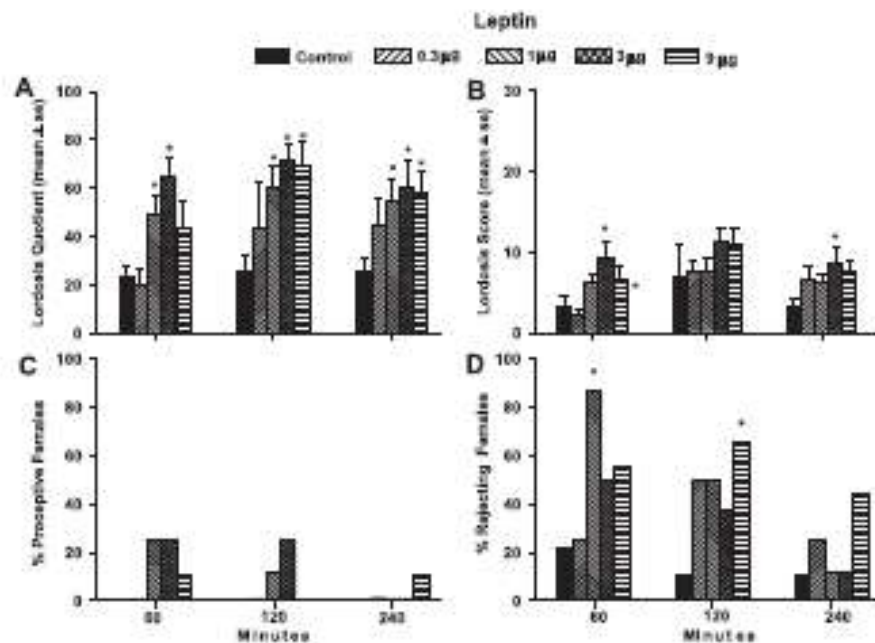


Fig. 1. Effect of the icv injection of 0.3 (n = 8), 1 (n = 8), 3 (n = 8) and 9 μ g (n = 8) of leptin to ovariectomized, estrogen-primed rats on: lordosis quotient (A); lordosis score (B); % proceptive females (C) and % rejecting females (D). Females were tested at 60, 120, and 240 min after injection of leptin or vehicle (control). * $p < 0.01$, $p < 0.05$ vs control.

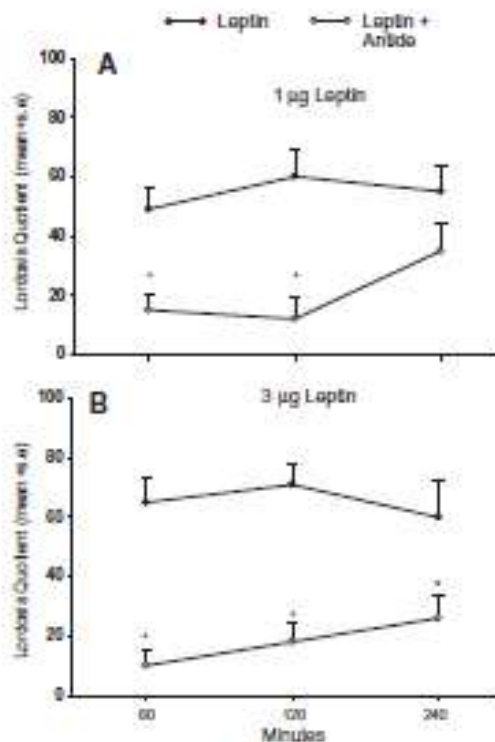


Fig. 2. Effect of icv injection of 1 µg of the GnRH-1 receptor antagonist antido on the facilitation of lordosis by 1 µg (A) and 3 µg of leptin (B). Facilitation of lordosis behavior by 1 µg/µl (9 animals) and 3 µg/µl (10 animals) of leptin at 60 and 120 min was inhibited by antido at 60 and 120 min post-injection. The antido or vehicle was injected 60 min before. * $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs antido plus leptin.

animals that under normal conditions function together. Interestingly, a significant proportion of leptin-treated rats showed intense and persistent rejection behaviors, which are rarely seen in receptive rats.

The mechanisms through which leptin exerts its diverse behavioral effects (facilitation of lordosis and rejection behaviors, inhibition of proceptivity) are not clear. A direct effect of leptin on hypothalamic neurons related to the expression of lordosis behavior cannot be ruled out. For example, administration of leptin activates the ventromedial hypothalamic neurons associated with lordosis facilitation (Schwartz et al., 1996); however, few or no leptin receptors are expressed in this region (i.e., ventrolateral part of the ventromedial hypothalamic nucleus (Funahashi et al., 2008; Brinquist et al., 1998). Our results strongly suggest that the effect of leptin on lordosis behavior is mediated through GnRH release, because icv administration of antido (an antagonist of the GnRH-1 receptor) prior to leptin inhibited the ability of leptin to facilitate lordosis. This interpretation is consistent with the finding that leptin stimulates the release of GnRH from hypothalamic explants (Yu et al., 1997; Watanabe, 2002). Stimulation of GnRH secretion by leptin may not involve direct actions of leptin on GnRH neurons, because double-labelling experiments using *in situ* hybridization and immunohistochemistry indicate that few, if any, GnRH neurons express leptin receptors in rats (Håkansson et al., 1998; Quenell et al., 2009) or in monkeys (Finn et al., 1998). This suggests that leptin stimulation of GnRH release is mediated through activation of afferent neurons that project to GnRH secreting cells (Cunningham et al., 1999).

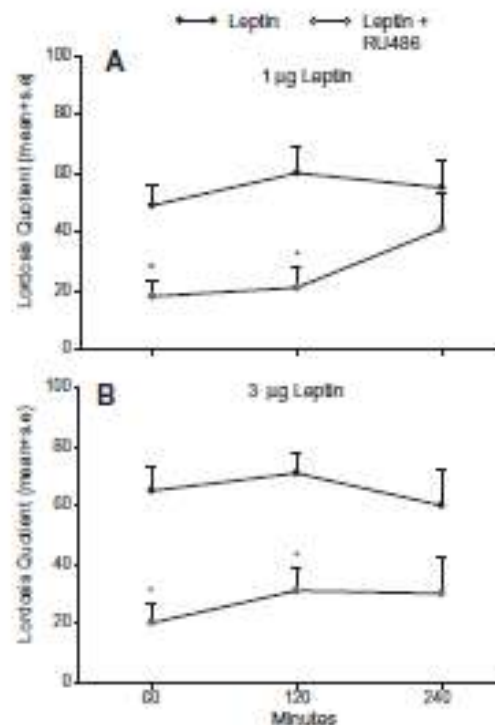


Fig. 3. Effect of icv injection of 5 mg of the progesterin receptor antagonist RU486 on the facilitation of lordosis by 1 µg (A; $n = 9$) and 3 µg of leptin (B; $n = 10$). The facilitation of lordosis behavior by leptin at 60 and 120 min was antagonized by RU486. The RU486 or vehicle was injected 60 min before leptin. * $p < 0.05$, * $p < 0.01$ vs RU486 plus leptin.

It is only possible to speculate on the intermediary neurotransmitter involved in the stimulatory effect of leptin on GnRH release. GnRH neurons receive a rich afferent input from axon terminals containing a large variety of agents including catecholamines, serotonin, GABA, glutamate, opioid peptides, neuropeptide Y, vasoactive intestinal peptide, neurotensin, substance P and kisspeptin (see review; Clarke and Pompolo, 2005). The effect of leptin on most of these neurotransmitters has not been explored. Moreover, in some cases, leptin inhibits rather than stimulates the release of these neurotransmitters. For example, *in vitro* studies indicate that leptin decreases basal NA release from the hypothalamus in a dose-dependent manner (Francis et al., 2004). In other cases, leptin stimulates the activity of afferent fibers to GnRH neurons, as in the case of kisspeptin (Smith et al., 2006; Kauffman et al., 2007). A substantial proportion of kisspeptin neurons in the arcuate nucleus express leptin receptors in mice (Smith et al., 2006), and in the mouse and rat hypothalamus, the kisspeptin receptor GPR54 is expressed in GnRH neurons, suggesting that kisspeptin may directly modulate GnRH secretion (Irwig et al., 2004; Messenger et al., 2005).

Regarding the display of rejection behaviors by rats treated with leptin, some data suggest that inhibition of the noradrenergic system may participate in this response. *In vitro* studies show that leptin decreases NA release from the hypothalamus in a dose-dependent manner (Francis et al., 2004). Inhibition of NA release significantly increases rejection behaviors (Meston et al., 1996). Inhibition of NA release also decreases ear wiggling, a typical proceptive behavior in rats (Meston et al., 1996). Therefore, it is possible that icv administration of leptin simultaneously activates two

mechanisms leading to opposing responses: (1) GnRH release, resulting in lordosis facilitation, and (2) inhibition of NA release, eliciting the display of rejection behaviors and inhibiting proceptivity. Under no experimental conditions, these responses are likely to be triggered separately depending on nutritional or metabolic conditions.

Recent studies suggest that progesterin receptors are a common effector for molecules of various structures that facilitate estrous behaviors in ovx, estrogen-primed rats (Beyer et al., 2003; Mani and Portillo, 2010). This idea is supported by the ability of progesterin receptor antagonists to interfere with the facilitatory effects on lordosis behavior not only of P but also of *fling A*-reduced progesterins, dopamine agonists, prostaglandin E₂ and GnRH (Beyer et al., 1997, 2003; Mani and Portillo, 2010). The fact that RU486 inhibited the lordosis behavior induced by leptin in the present study also suggests that this peptide mediates activation of progesterin receptors, perhaps via GnRH release.

The characteristics of the behavioral response to leptin, weak lordosis intensity (LS) and absence of proceptive behavior, does not support an essential role of this hormone in the display of estrous behavior during the ovarian cycle in *ad libitum*-fed rats. Leptin serum levels do not change significantly during the rat estrous cycle (Amico et al., 1998), and leptin receptor densities are low during proestrus (Bennett et al., 1999). On the other hand, it is well established that leptin participates in the initiation of puberty through the activation of GnRH neurons (Ahima and Flier, 2000; Mann and Plant, 2002). Therefore, it is tempting to speculate that under natural (non laboratory conditions), in which frequent anestrus periods are interspersed into the reproductive life of the rat (Knuth and Friese, 1983), leptin participates in reinitiating reproductive activity, including lordosis behavior, by priming or directly stimulating GnRH neurons. Support for this idea comes from the observation in Syrian hamsters that fasting-induced anestrus is reversed by leptin administration (Schneider et al., 1998). Further studies are required to establish the physiological role of leptin in the regulation of estrous behaviors in rats.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the technical assistance of Guadalupe Domínguez-López. This work was supported by PROM-EP/103.5/04/1294 and by the Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development/National Institutes of Health through cooperative agreement HD058155 as part of the Specialized Cooperative Centers Program in Reproduction and Infertility Research.

References

Ahima, R.S., Flier, J.S., 2000. Leptin. *Annu. Rev. Physiol.* 62, 413–437.

Amico, J.A., Thomas, A., Crowley, R.S., Barmes, L.A., 1998. Concentrations of leptin in the serum of pregnant, lactating, and cycling rats and of leptin messenger ribonucleic acid in rat placental tissue. *Life Sci.* 63, 1387–1395.

Beach, F.A., 1976. Sexual attractivity, proceptivity and receptivity in female mammals. *Horm. Behav.* 2, 105–130.

Bennett, P.A., Under, K., Wilson, C., Carlson, L.M., Carlson, B., Robinson, L.C., 1999. Cyclical variations in the abundance of leptin receptors, but not in circulating leptin, correlate with NPY expression during the oestrous cycle. *Neuroendocrinology* 69, 417–423.

Beyer, C., González-Flores, O., Gordo-Juárez, M., González-Martel, C., 2003. Non-ligand activation of estrous behavior in rodents: cross-talk at the progesterone receptor. *Scand. J. Psychol.* 44, 221–229.

Beyer, C., González-Flores, O., González-Martel, C., 1997. Progesterone receptor participates in the stimulatory effect of LH/β, prostaglandin E₂ and cyclic AMP on lordosis and proceptive behavior in rats. *J. Neuroendocrinol.* 9, 609–614.

Beyer, C., González-Martel, C., 1986. Elevation in hypothalamic cyclic AMP as a common factor in the facilitation of lordosis in rodents: a working hypothesis. *Ann. NY Acad. Sci.* 474, 270–281.

Bloch, G.J., Balchrook, A.M., Gorski, R.A., Mowbray, P.E., 1987. Cholecystinin stimulates and inhibits lordosis behavior in female rats. *Physiol. Behav.* 39, 217–224.

Campfield, L.A., Smith, F.J., Gates, V., Dener, R., Burn, P., 1995. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269, 546–549.

Carlo, J.J., Thompson, S., 2005. Synthesis and secretion of GnRH. *Annu. Rev. Physiol.* 67, 29–55.

Carrington, M.J., Clifton, D.K., Solner, R.A., 1999. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol. Reprod.* 60, 216–222.

Emquat, J.K., Bjebæk, C., Ahima, R.S., Flier, J.S., Saper, C.B., 1998. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 395, 535–547.

Evans, P.D., Carrington, M.J., Pua, K.Y., Spies, H.G., Clifton, D.K., Solner, R.A., 1998. The stimulatory effect of leptin on the neuronal reproductive axis of the monkey. *Endocrinology* 139, 4052–4062.

Fox, A.S., Fomonan, A., Oler, D.J., 2000. Effects of intracerebroventricular leptin administration on feeding and sexual behavior in lean and obese female Zucker rats. *Horm. Behav.* 37, 377–387.

Frantz, J., Mohankumar, S.M., Mohankumar, P.S., 2004. Leptin inhibits norepinephrine efflux from the hypothalamus in vitro: role of gamma-aminobutyric acid. *Brain Res.* 1021, 286–291.

Harahachi, H., Yata, T., Suzuki, S., Suda, S., 2003. Distribution, function, and properties of leptin receptors in the brain. *Int. Rev. Cytol.* 264, 1–27.

Gozalska, B.B., Gray, D.S., 1981. Receptivity, rejection and maturity in female rats following kainic acid and electrolytic septal lesions. *Physiol. Behav.* 26, 39–44.

Hakanian, M.L., Brown, H., Gilardi, N., Goold, R.C., Melner, B., 1998. Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *J. Neurosci.* 18, 559–572.

Hardy, D.F., Deloid, J.F., 1972. The relationship between levels of exogenous hormones and the display of lordosis by the female rat. *Horm. Behav.* 2, 287–297.

Iwig, M.S., Bailey, G.S., Smith, J.T., Archibe, B.V., Pops, S.M., Carrington, M.J., Gozalska, B.B., Clifton, D.K., Solner, R.A., 2004. Kisspeptin activation of gonadotropin-releasing hormone neurons and regulation of *KISS-1* mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* 80, 264–272.

Kauffman, A.S., Park, J.H., MPhil-Laird-Smith, A.A., Gozalska, B.B., Boda, C., Hohmann, J.G., Parlow, M.N., Rohde, A.D., Clifton, D.K., Solner, R.A., Raman, E.E., 2007. The kisspeptin receptor GPR54 is required for sexual differentiation of the brain and behavior. *J. Neurosci.* 27, 8025–8035.

Kauffman, A.S., Raman, E.E., 2004. A critical role for the evolutionarily conserved gonadotropin-releasing hormone II: modulation of energy status and female sexual behavior. *Endocrinology* 145, 3039–3046.

Knuth, J.A., Friese, H.G., 1983. Starvation induced anestrus: effect of chronic food restriction on body weight, its influence on oestrous cycle and gonadotropin secretion in rats. *Acta Endocrinol.* 104, 402–409.

Mani, S., Portillo, W., 2010. Activation of progesterin receptors in female reproductive behavior: interactions with neurosteroids. *Front. Neuroendocrinol.* 31, 157–171.

Mann, G.R., Plant, T.M., 2002. Leptin and pubertal development. *Semin. Reprod. Med.* 20, 93–102.

Messinger, S., Chazalaki, E.E., Ma, D., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Thresher, E.E., Malige, I., Lorne, D., Carlton, M.B., Colledge, W.H., Carney, A., Aparicio, S.A., 2005. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 1761–1766.

Minton, C.M., Mow, E.V., Gozalska, B.B., 1996. Effects of sympathetic inhibition on receptive, proceptive and rejection behavior in the female rat. *Physiol. Behav.* 59, 537–542.

Moss, R.L., Fomonan, M.M., 1976. Potentiation of lordosis behavior by intrahypothalamic infusion of synthetic luteinizing hormone-releasing hormone. *Neuroendocrinology* 20, 170–181.

Nagasaki, S., Gutsikonda, P., Thompson, R.C., Takamura, H., Maeda, K.I., Borer, D.L., 1998. Evidence for GnRH regulation by leptin: leptin administration prevents reduced pulsatile LH secretion during fasting. *Neuroendocrinology* 67, 170–175.

Palacios, G., Watson, C. (Eds.), 2005. The rat brain in stereotaxic coordinates. Australia Academic Press.

Quinnell, J.H., Maliga, A.C., Tapp, A., Liu, X., Phipps, S.J., Kemp, C.J., Hebbian, A.E., Graham, D.R., Anderson, G.M., 2009. Leptin indirectly regulates gonadotropin-releasing hormone neuronal function. *Endocrinology* 150, 2805–2812.

Sakuma, Y., Pfaff, D.W., 1980. LH-RH in the mesencephalic central grey can potentiate lordosis reflex of female rats. *Nature* 283, 505–507.

Schneider, J.E., Goldman, M.D., Tang, S., Bean, B., Ji, H., Friedman, M.I., 1998. Leptin indirectly affects estrous cycles by increasing metabolic fuel oxidation. *Horm. Behav.* 33, 217–228.

Schwartz, M.W., Selwyn, B.J., Campfield, L.A., Burn, P., Berkin, D.C., 1996. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J. Clin. Invest.* 98, 101–106.

Siegel, S., Castellan, N.J. (Eds.), 1995. Estadística no paramétrica: aplicada a las ciencias de la conducta. Trilce, México.

Smith, J.T., Archibe, B.V., Clifton, D.K., Solner, R.A., 2006. *KISS-1* neurons are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J. Neuroendocrinol.* 18, 298–303.

Vade, G.N., Campfield, L.A., Fribourg, A.K., Fribourg, R.M., Neustein, J.D., 1997. Leptin facilitates and inhibits sexual behavior in female hamsters. *Am. J. Physiol.* 272, 1354–1358.

Vázarová, H., 2002. Leptin directly acts within the hypothalamus to stimulate gonadotropin-releasing hormone secretion in vivo in rats. *J. Physiol.* 545, 255–268.

Yu, W.H., Kimura, M., Watanabe, A., Kanath, S., McCann, S.M., 1997. Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 1023–1028.

13.2. Resumen de congreso



Título: LA LEPTINA INDUCE CONDUCTA DE LORDOSIS A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE GNRH COMO EL DE PROGESTERONA

Autor: DOMÍNGUEZ ORDÓÑEZ RAYMUNDO

Correo electrónico: oglezflo@prodigy.net.mx

Institución: CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN REPRODUCCIÓN ANIMAL, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA-CINVESTAV¹; MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA², INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA, B.U.A.P.³

Aval: GONZÁLEZ FLORES OSCAR

Correo electrónico aval: oglezflo@hotmail.com

Institución aval: CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN REPRODUCCIÓN ANIMAL, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA-CINVESTAV

Autores: DOMÍNGUEZ ORDÓÑEZ R^{1,2}, GARCÍA-JUÁREZ M¹, SOTO-SÁNCHEZ A¹, GÓMORA-ARRATI P¹, EGUIBAR JR³, BEYER C¹, GONZÁLEZ FLORES O¹.

Resumen: La leptina, es una proteína producida principalmente por las células adiposas, y es una hormona que participa importantemente en varios fenómenos reproductivos. Sin embargo, no se conoce el papel que juega en la regulación de la conducta sexual femenina en roedores. Por lo tanto, en el primer experimento decidimos analizar la conducta de estro (lordosis y proceptividad) inducida por leptina. Se administraron diferentes dosis intracerebroventriculares (icv) (0.33 a 9 µg), para evaluar si este compuesto es capaz de inducir la conducta de estro en ratas pretratadas con estrógenos. Las curvas dosis-respuesta muestran que 1 y 3 µg de leptina inducen un incremento significativo en la lordosis a los 120 minutos ($P < 0.01$) después de su administración icv. Sin embargo, estas dosis de leptina indujeron poca proceptividad. Adicionalmente, la intensidad de la lordosis fue baja, pero con una alta incidencia de conductas de rechazo (vuelta, boxeo y huida). En el segundo experimento, exploramos si la conducta de lordosis inducida por leptina involucra la participación tanto del receptor a gonadotropinas (GnRH), como del receptor a progesterona (RP). Para tal propósito, a ratas estrogenizadas e inyectadas icv con 1 o 3 µg de leptina, se les administró 1 µg icv de antide, inhibidor del receptor GnRH-1 o 5 mg sc de la antiprogesterina RU486, una hora antes de la administración de leptina. Tanto el antide como el RU486, disminuyeron la conducta de lordosis inducida por ambas dosis de leptina. Los resultados muestran que la leptina podría estimular la conducta de lordosis, a

través de la liberación de GnRH y ésta a su vez activar a los RPs en el hipotálamo. Esta hipótesis es apoyada ya que en trabajos previos realizados por nosotros, encontramos que la conducta de estro inducida por el GnRH fue bloqueada por el RU486. Financiado por PROMEP 103.5/09/1294 a OGF y parcialmente por CONACYT 168894 por JRE.