



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Mecanismos celulares involucrados en la estimulación
de la conducta de lordosis inducida por la
administración de 17- β estradiol en la rata**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Raymundo Domínguez Ordóñez

Director

Dr. Oscar González Flores

Tlaxcala, Tlax.

Febrero, 2017



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Mecanismos celulares involucrados en la estimulación
de la conducta de lordosis inducida por la
administración de 17- β estradiol en la rata**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Raymundo Domínguez Ordóñez

Director

Dr. Oscar González Flores

Tutores

Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio

Dra. Wendy Portillo Martínez

Tlaxcala, Tlax.

Febrero, 2017

FINANCIAMIENTO

Esta tesis se realizó en el Centro de Investigación en Reproducción Animal, unidad Panotla, de la Universidad Autónoma de Tlaxcala – Centro de Investigaciones Avanzadas del Instituto Politecnico Nacional.

El proyecto fue realizado con el financiamiento económico del CONACYT número 134291.

Además, el CONACYT otorgó la beca de Doctorado número 230658, a partir del 4 de febrero de 2013 al 3 de febrero de 2017.



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado

Doctorado en Ciencias Biológicas



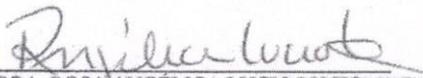
POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

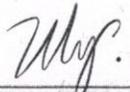
COORDINACIÓN DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
PRESENTE

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Raymundo Domínguez Ordóñez** realiza para la obtención del grado de **Doctor 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 "**Mecanismos celulares involucrados en la estimulación de la conducta de lordosis inducida por la administración de 17- β estradiol en la rata**".

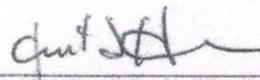
Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

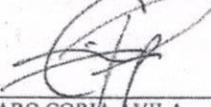
ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., ENERO 13 DE 2017


DRA. ROSA ANGÉLICA LUCIO LUCIO


DRA. WENDY PORTILLO MARTÍNEZ

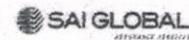

DR. MARCOS GARCÍA JUÁREZ


DR. KURT LEROY HOFFMAN TIBER


DR. GENARO CORIA AVILA



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:
ISO 9001:2008-NMX-CC-9001-IMNC-2008



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

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, por permitirme y brindarme el apoyo para mi formación como Doctor en Ciencias Biológicas.

Al CONACYT, por haberme otorgado la beca número 328798, a partir del 4 de febrero de 2013 al 3 de febrero de 2017, con la finalidad de cursar el Doctorado 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 enseñar el maravilloso mundo de la ciencia.

A la Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio, por todo su apoyo e interés en la revisión de este trabajo de tesis.

A la Dra. Wendy Portillo Martínez por su gran empeño en la realización, revisión y asesoría de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO 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 Dr. 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 papá, Mada, 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 mamá, Juanita, quien con su amor, afecto y apoyo sincero, me ha ayudado a superar las situaciones más difíciles de mi vida.

A mi esposa, Inés, 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, por brindarme alegría en cada día y por ser mi motivación para seguir adelante.

A mi bebé, Alex, quien me da alegría y ternura con todas sus travesuras.

A mi hermano, Tino, quien siempre ha sido mi ejemplo a seguir, quien me ha enseñado que cada quien puede forjar su propio futuro.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El ciclo estral de la rata	1
1.2. Conducta de estro en la rata	3
1.3. Regulación hormonal de la conducta de lordosis en la rata	4
1.4. Neuroanatomía de la conducta de lordosis	7
1.5. El receptor intracelular a progesterona	12
1.5.1. Características estructurales y farmacológicas del receptor a progesterona	13
1.5.2. El receptor a progesterona como una fosfoproteína	16
1.5.3. Correlación entre la concentración del receptor a progesterona y la expresión de la conducta de lordosis	17
1.5.4. Características estructurales y farmacológicas del RU486	19
1.5.4.1. Mecanismo de acción del antagonista RU486	19
1.6. Estrógenos	20
1.6.1. Síntesis de estrógenos en los ovarios	21
1.6.2. Síntesis de estrógenos en el cerebro	21
1.6.3. Inactivación de 17- β estradiol	22
1.6.4. Receptores a estrógenos	22
1.6.4.1. Receptores α y β a estrógenos	23
1.6.4.2. Localización de los receptores a estrógenos en el cerebro	24
1.6.4.3. Regulación de los receptores a estrógenos intracelulares	25
1.6.5. Algunos eventos fisiológicos regulados por estrógenos	26
1.6.6. Tamoxifén	27
1.7. Fosforilación de proteínas	28
1.7.1. Proteínas cinasas	29
1.7.2. Proteínas fosfatasas	30

1.7.3. Fosfoproteínas	30
1.7.4. Proteína cinasa A	31
1.7.5. Proteína cinasa G	31
1.7.6. Proteína cinasa Src	32
1.7.8. Proteína cinasa activada por mitógeno	34
1.7.9. PKA, PKG, Src y MAPK en la conducta de lordosis	35
1.8. Mecanismos celulares involucrados en la inducción de la conducta de lordosis	36
1.8.1. Mecanismo genómico	36
1.8.2. Mecanismo extragenómico	38
1.8.3. Modelo de la comunicación cruzada entre los mecanismos genómico y extragenómico para la estimulación de la conducta de lordosis	40
2. ANTECEDENTES	43
3. JUSTIFICACIÓN	46
4. HIPÓTESIS	47
5. OBJETIVOS	48
5.1. Objetivo general	48
5.2. Objetivos específicos	48
6. METODOLOGÍA	49
6.1. Características de los animales	49
6.2. Procedimientos quirúrgicos	49
6.3. Evaluación de la conducta de lordosis	52
6.4. Análisis estadístico	52
6.5. Procedimiento experimental	53
6.5.1. Experimento 1. <i>Efecto de la administración de diferentes dosis de 17-β estradiol por vía intracerebroventricular (icv) sobre la conducta de lordosis en ratas ovariectomizadas-pretratadas con benzoato de 17-β estradiol.</i>	53
6.5.2. Experimento 2. <i>Efecto del tamoxifén, modulador selectivo de los receptores a estrógenos, sobre la expresión de la conducta de lordosis</i>	53

<i>inducida por la inyección icv de 17-β estradiol, en ratas ovariectomizadas-pretratadas con benzoato de 17-β estradiol.</i>	
6.5.3. Experimento 3. <i>Efecto de la administración icv de la antiprogestina RU486, antagonista del receptor a progesterona, sobre la expresión de la conducta de lordosis inducida por la administración icv de 17-β estradiol, en ratas ovariectomizadas-pretratadas con benzoato de 17-β estradiol.</i>	53
6.5.4. Experimento 4. <i>Efecto de la administración icv del RpcAMPs, KT5823, PD98059 y PP2, inhibidores de las proteínas cinasas A, G, MAPK y Src respectivamente, sobre la expresión de la conducta de lordosis inducida por la administración icv de 17-β estradiol en ratas ovariectomizadas-pretratadas con benzoato de 17-β estradiol.</i>	54
7. RESULTADOS	55
7.1. Experimento 1. <i>Efecto de la administración de diferentes dosis de 17-β estradiol por vía icv sobre la conducta de lordosis en ratas ovariectomizadas-pretratadas con BE.</i>	55
7.2. Experimento 2. <i>Efecto del tamoxifén, modulador selectivo de los receptores a estrógenos, sobre la expresión de la conducta de lordosis inducida por la inyección icv de 17-β estradiol, en ratas OVX-pretratadas con BE.</i>	57
7.3. Experimento 3. <i>Efecto de la administración icv de la antiprogestina RU486, antagonista del receptor a progesterona, sobre la expresión de la conducta de lordosis inducida por la administración icv de 17-β estradiol, en ratas OVX-pretratadas con BE</i>	57
7.4. Experimento 4. <i>Efecto de la administración icv del RpcAMPS, KT5823, PD98059 y PP2, inhibidores de las proteínas cinasas A, G, MAPK y Src respectivamente, sobre la expresión de la conducta de lordosis inducida por la administración icv de 17-β estradiol en ratas ovariectomizadas-pretratadas con BE.</i>	60
8. DISCUSIÓN	66
9. CONCLUSIONES	80

10. PERSPECTIVAS	82
11. REFERENCIAS	83
12. GLOSARIO DE TÉRMINOS	117
13. ANEXOS	119
13.1 Ponencias	119
13.1.1. Las cinasas A, G y MAPK median la conducta de lordosis inducida por 17- β estradiol. Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. 6/9/2015.	120
13.1.2. La lordosis inducida por estradiol es modulada por los receptores a estrógenos y a progesterona. Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. 31/8- 4/9/2014.	121
13.1.3. Mecanismos celulares involucrados en la facilitación de la conducta de lordosis inducida por la administración de estradiol en la rata. Seminario del Posgrado en Ciencias Biológicas UAT. 19/9/2014.	122
13.1.4. La conducta de lordosis inducida por estradiol libre en la rata es dependiente de la dosis de benzoato de estradiol utilizada en el pretratamiento. Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. 1-5/9/2013.	123
13.1.5. El estradiol puede facilitar la conducta de estro en ratas ovariectomizadas al actuar a través de los receptores a estrógenos y a progesterona. Reunión anual XXXVIII de la Académia de Investigación en Biología de la Reproducción. 11-14/6/2013.	124
13.2. Capítulos en libros	125
13.2.1. The cellular and molecular mechanisms driving the estrogenic modulation of synaptic activity in mnemonic information processing. Synaptic fundamentals of memory performance. 2015.	126
13.2.2. Importancia de la proteína cinasa Src sobre la activación de la conducta sexual femenina en la rata. Efecto de las hormonas esteroides sobre procesos fisiológicos y reproductivos. 2015.	128
13.2.3. Estrógenos y conducta sexual femenina en la rata. Efecto de las hormonas esteroides sobre procesos fisiológicos y reproductivos. 2015.	129
13.2.4. Mecanismos celulares que regulan la expresión de la conducta	131

sexual femenina. Biología celular y molecular de las conductas reproductivas. 2013.

13.2.5. Modulación de la conducta de estro por el receptor a progesterona en la rata y la coneja. Biología celular y molecular de las conductas reproductivas. 2013. 132

14. PUBLICACIONES 133

14.1. Sexual receptivity facilitated by unesterified estradiol: dependence on estrogen and progestin receptors and priming dose of estradiol benzoate. Behavioral Neuroscience. 2015. 134

14.2. Estrogen receptor α and β are involved in the activation of lordosis behavior in estradiol-primed rats. Hormones and Behavior. 2016. 146

14.3. Las hormonas y la conducta sexual femenina. Ciencia, Revista de la Academia Mexicana de Ciencias. 2015. 153

RESUMEN

El mecanismo celular por el cual el 17- β estradiol activa la conducta de lordosis (CL) ha sido menos estudiado que el efecto sinérgico entre este esteroide y la progesterona, por lo que fue importante hacer este estudio, ya que se conoce que la rata hembra al alcanzar la madurez sexual presentan un pico de 17- β estradiol cada 4 ó 5 días, seguido por un pico de progesterona (Freeman 2005) y solo se había propuesto que esa acción sinérgica era la encargada de disparar los diferentes componentes de la conducta de estro (lordosis y proceptividad). Este pico de 17- β estradiol ha resultado ser de una gran importancia en el estudio de la CL, ya que diferentes grupos de investigación han publicado que la inyección de diferentes dosis de 17- β estradiol inducen CL. Además, se ha encontrado mediante experimentos *in vitro*, que la adición de 17- β estradiol a cultivos de células incrementa la actividad de diferentes proteínas cinasas, como la A, G, MAPK y Src. Este hecho sugiere que el mecanismo de acción del 17- β estradiol en la inducción de la CL podría ser a través de la activación de estas proteínas cinasas, ya que estas últimas se encuentran involucradas en la inducción de la CL.

En esta tesis se muestran los resultados obtenidos de cuatro experimentos en donde se probó la capacidad de diferentes dosis de 17- β estradiol administradas por vía intracerebroventricular (icv) para inducir la expresión de la CL en ratas previamente tratadas con benzoato de 17- β estradiol (BE) inyectado por vía subcutánea (sc). Además, se evaluó la participación, en el cerebro, de los receptores a estrógenos (RE), el receptor a progesterona (RP) y, sí las diferentes proteínas cinasas como; la A, G, MAPK y Src ejercen algún efecto sobre dicha conducta inducida con sólo 17- β estradiol. Se utilizaron 145 ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley, las cuales en el día 0 fueron ovariectomizadas (OVX) y ocho días después se les colocó una cánula de acero inoxidable en el ventrículo lateral derecho. Ocho días después todas las hembras recibieron un pretratamiento con 5 μ g de BE sc, posteriormente se formaron diferentes grupos de animales, a los que se les administró a las 39.5 ó bien a las 40 horas la inyección icv de los diferentes tratamientos experimentales de acuerdo al experimento en cuestión.

En el primer experimento, se realizó una curva dosis respuesta mediante la administración de dosis subumbrales de 17- β estradiol (0.016, 0.08, 0.4, 2 ó 10 ng) a diferentes grupos de hembras. En el segundo y tercer experimento, se exploró la participación del RE y el RP a través de la inyección de los antagonistas tamoxifén ó RU486, respectivamente a diferentes grupos de hembras, 30 minutos antes de la infusión de 2 ng de 17- β estradiol. En el experimento 4, la

participación de diferentes vías de señalización intracelular involucradas en la expresión de la CL inducida por 2 ng de 17- β estradiol en ratas previamente estrogenizadas fue estudiada a través de la administración de los siguientes compuestos; RpcAMPs (0.2 μ g), KT5823 (0.12 μ g), PD98059 (3 μ g) y PP2 (30 μ g), inhibidores de las proteínas cinasas A, G, MAPK y Src respectivamente. La evaluación de la CL se realizó a los 30, 120 y 240 minutos después de la inyección de 17- β estradiol, en arenas circulares de Plexiglás, en las que se encontraban machos sexualmente expertos.

Los resultados del experimento 1 muestran que El 17- β estradiol, al ser administrado en ciertas concentraciones a ratas OVX-pretratadas con BE, indujeron la CL, por ejemplo, las dosis de 0.4 y 10 ng de 17- β estradiol indujeron clara CL, sin embargo, la dosis de 2 ng fue la que indujo una mayor respuesta a los diferentes tiempos probados.

Los experimentos 2 y 3, mostraron que el RE modula la inducción de la CL inducida por 17- β estradiol, ya que la administración de 5 μ g de tamoxifén disminuyó dicha conducta. Interesantemente, el RP también participa en la inducción de la CL por 17- β estradiol, ya que la infusión de 5 μ g de RU486 también disminuyó la lordosis.

Finalmente, los datos del experimento 4 muestran que la participación de las proteínas cinasas A y G son reguladoras importantes en la inducción de la CL inducida por 17- β estradiol, ya que se encontró que la inyección de 2 μ g de RpcAMPs o de 0.12 μ g de KT5823 (inhibidores de las cinasas A y G respectivamente) disminuyeron el despliegue de esta conducta inducida por 17- β estradiol. Los resultados también muestran que la MAPK se encuentra involucrada en la activación de la CL por 17- β estradiol, ya que la inyección de 3.3 μ g de PD98059 disminuyó la lordosis inducida por 17- β estradiol a los tres tiempos probados. Por último, encontramos que la infusión de 30 μ g de PP2 redujo la CL a los diferentes tiempos probados. Este hecho indica que la cinasa Src participa en la expresión de la CL.

Con base a las evidencias obtenidas en el presente trabajo, se puede concluir que el 17- β estradiol induce CL en el modelo de la rata OVX-pretratada con BE y, para ello utiliza diferentes receptores, como los RE y el RP, así como diversas proteínas cinasas, por lo que su papel en el sistema nervioso central es muy complejo debido a la interacción y la convergencia entre diferentes vías de señalización intracelular y de las moléculas implicadas en las vías, las cuales podrían actuar como mecanismos reforzadores para alcanzar la integración neuroendocrina requerida para la expresión de la CL en la rata.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El ciclo estral de la rata

El ciclo estral, en las hembras de los mamíferos, se define como el intervalo de tiempo comprendido entre dos ovulaciones, las cuales son acompañadas por la manifestación de la conducta de estro. Sin embargo, la rata presenta un ciclo estral de corta duración (4 ó 5 días), debido a la falta de un cuerpo lúteo funcional, a pesar de ello se pueden observar cuatro diferentes etapas (proestro, estro metaestro y diestro, ver tabla 1) las cuales se caracterizan por cambios a nivel endocrinológico, histológico y conductual (Freeman 2005).

Proestro

Este periodo se caracteriza porque presenta una duración de 12 a 14 horas y es donde la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH en inglés) se libera de la eminencia media hacia el sistema venoso portal hipofisiario, viaja hacia la hipófisis anterior y al actuar sobre sus células blanco, provoca la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH en inglés). Esta hormona, al actuar sobre los ovarios, induce un crecimiento folicular que produce la secreción de cantidades crecientes de estrógenos, principalmente 17- β estradiol (Tabla 1), que cuando ejerce efectos sobre el hipotálamo provoca la liberación de GnRH. A su vez, la GnRH puede activar a sus receptores ubicados en la hipófisis anterior en donde liberará a la hormona luteinizante (LH en inglés) hacia la circulación sanguínea, a través de la cual, viaja hasta el ovario en donde actúa sobre el folículo maduro para producir la ovulación y la posterior formación espontánea del cuerpo lúteo, el cual producirá y secretará a la progesterona hacia el torrente circulatorio (Freeman 2005). De manera muy importante, durante la tarde-noche de esta fase del ciclo estral, se observa un pico en los niveles plasmáticos de progesterona, lo que permite que la rata manifieste su conducta sexual (Freeman 2005), sin embargo, para que el cuerpo lúteo sea funcional, durante la gestación o en la pseudogestación, se requiere de la cópula, ya que la estimulación cervical, provista por el macho, está asociada a un incremento en los picos de secreción de prolactina (diurno y nocturno; Freeman y Neill 1972, Butcher y cols. 1972) en sangre, y se ha demostrado que durante la gestación o en la pseudogestación (Freeman y Neill 1972, Freeman y cols. 1974) existe una elevación en los picos de esta hormona. Además, la elevación en los niveles de prolactina se ha asociado con una disminución en la concentración de dopamina (de Greef y Neill 1979), el incremento en la

secreción del péptido intestinal vasoactivo (Bertram y cols. 2006), así como de oxitocina (McKee y cols. 2007).

Estro

Esta etapa tiene una duración de 25 a 27 horas y es cuando la hembra muestra el máximo nivel de receptividad sexual (periodo en donde puede copular con el macho). Durante esta fase, los niveles plasmáticos de progesterona (proveniente del cuerpo lúteo recién formado) continúan elevados (Freeman 2005), provocando una disminución en la liberación hipotalámica de GnRH y por lo tanto la disminución de la secreción de las hormonas hipofisarias, lo que impide el crecimiento de folículos nuevos y a consecuencia de ello no se produce una segunda ovulación dentro del mismo ciclo estral.

Metaestro

Esta fase es relativamente breve, ya que muestra una duración de 6 a 8 horas y es el periodo en el cual la conducta de estro ya no se presenta. Sin embargo, el cuerpo lúteo recién formado produce otro pico de progesterona (Freeman 2005), que al no existir embarazo rápidamente deja de ser funcional, es decir, deja de secretar progesterona.

Día	Estradiol (pg/ml)	Progesterona (ng/ml)
Metaestro	15.54 ± 1.01*	12.83 ± 2.33 ⁺
Diestro	8.04 ± 2.63	10.47 ± 4.73
Proestro	38.57 ± 4.77 ^{&}	5.90 ± 2.57
Estro	6.82 ± 1.33	4.63 ± 1.37

Tabla 1. Concentraciones de 17-β estradiol y progesterona en suero durante el ciclo ovárico de la rata, metaestro (n = 4), diestro (n = 4), proestro (n = 4) y estro (n = 4). Las concentraciones de ambos esteroides fueron determinadas por radioinmunoensayo. Los datos están expresados como la media ± error estándar. [&] p < 0.05 con respecto al estro, metaestro y diestro *p < 0.05 con respecto al diestro y estro y ⁺p < 0.05 con respecto al proestro y el estro. Modificado de Guerra-Araiza y cols. 2003.

Diestro

Esta etapa, cuando la rata no copula, es la que muestra la duración más larga, entre 55 y 57 horas, ya que los niveles de progesterona producida por los ovarios se encuentran muy elevados, lo que ocasiona la disminución del número de receptores a GnRH en la hipófisis anterior (Witcher y cols. 1984), causando un efecto antiestrogénico que mantiene bajos los niveles de 17- β estradiol, lo que genera un periodo de reposo en la actividad hipofisiaria. Si al final del diestro no se ha producido la implantación embrionaria, las concentraciones de progesterona generadas por el cuerpo lúteo en regresión (ocasionada por la ausencia de factores luteotróficos y la secreción de luteolisinas provenientes del útero) disminuyen y se comienza a producir un incremento en las concentraciones de 17- β estradiol proveniente de las células de la granulosa, provocando la desinhibición de la hipófisis anterior y por lo tanto el reinicio de un nuevo ciclo estral debido a la liberación de FSH (Freeman 2005).

1.2. Conducta de estro en la rata

La conducta de estro es manifestada por la rata hembra con el propósito de establecer contacto suficiente con un macho sexualmente experto y copular con él (Beach 1976, Erskine 1989, Micevych y Dewing 2011). La expresión de esta conducta depende de la acción sinérgica entre el 17- β estradiol y diferentes moléculas como; la progesterona, GnRH, prostaglandina E₂, etc., lo que ocasiona que la hembra despliegue una serie de aspectos característicos de su estado reproductivo, con la finalidad de que sean detectados por el macho y lo motiven para que se produzca la cópula (Beyer y cols. 2003).

Los aspectos característicos de la conducta de estro han sido definidos como: atractividad, proceptividad y receptividad, los cuales comienzan a presentarse durante la tarde-noche del proestro. Así, la atractividad comprende cambios a nivel morfológico y fisiológico, por ejemplo, cambios en la coloración del área genital y la producción de feromonas (Beach 1976, Beyer y cols. 2007). La proceptividad se refiere a una serie de conductas estereotipadas que despliega la hembra y que son dirigidas hacia el macho, estimulándolo a copular con ella. Dentro de las conductas proceptivas se pueden distinguir tres tipos, 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 a la vibración de alta frecuencia de la cabeza de la hembra a consecuencia de la monta del macho (Beach 1976) o previo a la monta. Finalmente, en la rata como en otras especies de mamíferos, el patrón conductual más representativo de la receptividad sexual es la adopción de la CL, la cual es un reflejo que se presenta cuando el macho monta a la hembra (Figura 1).

Este reflejo consiste en la dorsiflexión de la columna vertebral que se acompaña de la elevación de la región perigenital, 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 1972, Beach 1976, Beyer y cols. 2007, Micevych y Dewing 2011). La receptividad sexual de la rata hembra se evalúa a través del cociente de lordosis (LQ del inglés *lordosis quotient*, Hardy y DeBold 1972, Beach 1976, Micevych y Dewing 2011), que resulta al dividir el número de veces que la hembra hace lordosis en diez oportunidades de ser montada por el macho entre diez y el resultado multiplicarlo por cien. Además, Hardy y DeBold (1972) con el propósito de evaluar la intensidad de la lordosis propusieron una escala que va de 0 a 3, dependiendo del grado de dorsiflexión de la columna vertebral que manifieste la hembra al ser montada por el macho (Figura 1). La IL es un parámetro cualitativo, que nos puede indicar que tan receptiva se encuentra la hembra, ya que la IL está asociada a la potencia del agente lordogénico en cuestión para inducir CL (Hardy y DeBold, 1971).

1.3. Regulación hormonal de la conducta de lordosis en la rata

Las hormonas sexuales, principalmente el 17- β estradiol y la progesterona activan diversas estructuras cerebrales involucradas en el despliegue de la CL en roedores (Beach 1942, Edwards y cols. 1968, Beyer 1980). Por ejemplo, en la rata se origina un incremento gradual en la secreción de 17- β estradiol por los ovarios durante las primeras horas del ciclo estral, alcanzando su nivel máximo en la tarde del proestro (Tabla 1). Unas horas después del pico de 17- β estradiol, el ovario comienza a secretar, por las células de la teca interna, a la progesterona, que alcanza su nivel más alto en la noche del proestro (Edwards y cols. 1968, Ichikawa y cols. 1974, Clemens y Weaver 1985) un evento que coincide con el inicio de la receptividad sexual.

Se ha propuesto que el 17- β estradiol actúa inicialmente sensibilizando a las áreas cerebrales relacionadas con la expresión de la CL, como el área preoptica media (APOm), el nucleo ventromedial del hipotálamo (HVM), sustancia gris central mesencefálica, habénula, etc.),

mientras que la progesterona es quien dispara dicho comportamiento (Edwards y cols. 1968, Yanase y Gorski 1976, Beyer 1980). Esta idea es apoyada por que al realizar la OVX en la tarde del proestro, es decir, antes del pico preovulatorio de progesterona, la hembra no despliega la CL a pesar de haber estado expuesta a niveles máximos de 17- β estradiol (Powers 1970).

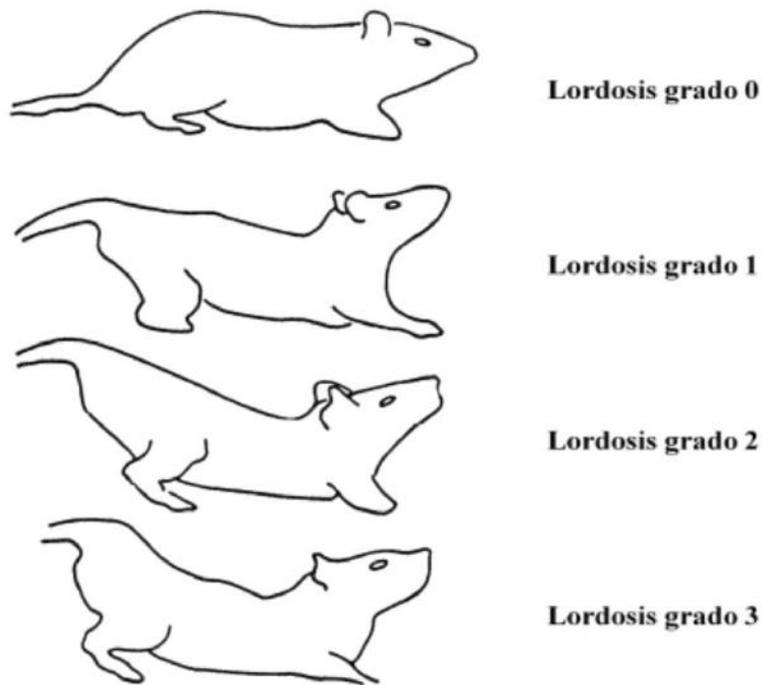


Figura 1. Escala de la *intensidad de lordosis en la rata*. La figura muestra los diferentes grados de la intensidad de lordosis que la ratona hembra en estro presenta al ser montada por un macho sexualmente experto. Modificada de Hardy y DeBold 1972.

En este experimento, Powers utilizó ratas con un ciclo estral de 4 días, y realizó la OVX a la hora 0 (hembras expuestas a una concentración máxima de 17- β estradiol pero no al pico de progesterona) y hora 6 (animales expuestos a la acción secuencial de 17- β estradiol y progesterona) del día esperado del estro, para ello, anestesió a las ratas con metoxifluorano, las cuales se recuperaron completamente de la anestesia a los 15 a 20 minutos después de la inyección de este fármaco. Finalmente, las pruebas conductuales para ambos grupos de hembras se realizaron a la hora 12, es decir el tiempo en que la respuesta sexual podría haber sido mayor en ausencia de la intervención quirúrgica (Powers 1970).

Mientras que sí la OVX se realiza después de que ocurrió el pico de progesterona (Moreines y Powers 1977), la rata aún será capaz de manifestar CL al ser montada por el macho (Powers 1970, Clemens y Weaver 1985). Además, la CL 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 cols., en la década de los 70s (Beyer y cols. 1971, Morali y Beyer 1979), demostraron que el 17- β estradiol es el estrógeno más potente para inducir receptividad en la rata OVX, seguido por la estrona y el estriol. Otros estudios han revelado que la dosis de 17- β estradiol, administrada al animal, se encuentra relacionada con la expresión de los componentes de la conducta de estro, por ejemplo, la intensidad de la dorsiflexión de la columna es mayor conforme se incrementa la dosis de esta hormona, de igual modo, la frecuencia con que la hembra presenta las diferentes conductas proceptivas se incrementa, aunque estas conductas han sido mayormente atribuidas a los efectos de la progesterona (Hardy y DeBold 1972, Whalen 1974, Fadem y cols. 1977). Además, en ratas OVX tratadas con dosis crecientes de BE, 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 CL es estimulada por la sola administración de diferentes estrógenos a ratas (Beyer y cols. 1971) y cobayos OVX (Pfaff y Sakuma 1980), como se mencionó en secciones anteriores, la inyección de progesterona incrementa el nivel de receptividad (aumenta el LQ, la IL y la proceptividad) en comparación con el obtenido por la sola infusión de estrógenos (Beach 1942, Zucker y Goy 1967, Edwards y cols. 1968). No obstante, para que la progesterona induzca CL es de crucial importancia que las hembras hayan estado previamente expuestas a estrógenos por un periodo mínimo de tiempo, entre 12 y 18 horas, ya que con ello se puede producir la síntesis de diferentes proteínas, como el RP (Parsons y cols. 1980).

Por otro lado, la latencia para que las ratas OVX pretratadas con BE muestren CL después de la inyección de la progesterona depende de la vía y la forma de administración utilizada. Por ejemplo, si la progesterona se administra por vía subcutánea (sc), la receptividad aparecerá entre 2 y 6 horas después (Glaser y Barfield 1984), mientras que la inyección por vía intravenosa de esta hormona (Kubli-Garfias y Whalen 1977) produce que la latencia de la lordosis sea menor y comience a observarse alrededor de los 5 a 10 minutos post-inyección (Ross y cols. 1971, Kubli-Garfias y Whalen 1977). Además, cuando la progesterona es administrada directamente al tejido nervioso relacionado con la lordosis, HVM o APOm, en forma de cristales (Glaser y cols. 1985)

la latencia de aparición de la lordosis se acorta significativamente, en relación al efecto que se produce cuando la progesterona es administrada por vía sc (Beyer y cols. 2003), sin embargo, la latencia de la CL aun es mucho mayor comparada con la administración intravenosa. Asimismo, Beyer y cols. (1988), demostraron que la administración de diferentes progestinas (progesterona, o algunos de sus metabolitos como la 5 α -pregnandiona, la 20 α - y 20 β -OH-pregnanona, la 5 β ,3 β ; 5 α ,3 β y la 5 α ,3 α -pregnanolona) en microdepósitos oleosos directamente en el HVM o en el APOm, indujeron la CL con latencias muy cortas, debido a que los compuestos pudieron difundirse más fácilmente que cuando fueron administrados en cristales en esas mismas áreas cerebrales (Beyer y cols. 1988). Por ejemplo, se ha encontrado que la 5 β , 3 β pregnanolona, un metabolito de la progesterona, es muy efectiva para inducir CL tanto implantada en forma de cristales (Rodríguez-Manzo y cols. 1986) como administrada en microdepósitos oleosos en el APOm. Además, la administración en soluciones oleosas directamente en el APOm y en el HVM de progestinas 5 α reducidas (5 α , 3 α pregnandiona y 5 α , 3 β pregnanolona), también inducen intensa CL en ratas OVX pretratadas con BE (Beyer y cols. 1988). Sin embargo, se ha encontrado que algunas progestinas administradas en cristales en el APOm son muy poco efectivas en inducir CL (Rodríguez-Manzo y cols. 1986). Este efecto pudiera deberse a problemas de difusión, ya que las progestinas diluidas 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 CL tienen una distribución muy separada (Morrell y cols. 1986). Una estrategia ampliamente utilizada en nuestro laboratorio y que consideramos que nos permite asegurar que el compuesto utilizado llegue a las áreas cerebrales relacionadas con la expresión de la CL es realizar implantes en el ventrículo lateral derecho, 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 del agente lordogénico.

1.4. Neuroanatomía de la conducta de lordosis

Módulo espinal

La mayor parte de la información somatosensorial que la hembra recibe por la monta del macho sobre la región perianal, la grupa y los flancos, durante la cópula (Kow y Pfaff 1979), converge en

las láminas II, V y X de los segmentos lumbar 6-sacro 1/sacro 2 de la médula espinal (Figura 2; Chinapen y cols. 1992, Lee y Erskine 1996). La activación de estas zonas depende de las contracciones vagino-cervicales y varía con las distintas fases del ciclo estral (Ghanima y cols. 2000), ya que las hormonas esteroides desempeñan un papel relevante en este patrón de activación nervioso (Pfaus y cols. 1996). Así, Komisaruk y cols. (1972), encontraron que el tamaño de los campos receptivos de las neuronas sensoriales de estas regiones se incrementa cuando las hembras son tratadas con 17- β estradiol, ya que las neuronas sensitivas de las astas dorsales de la médula espinal poseen RE. Además, diversos grupos de investigación también han encontrado la presencia del RP en motoneuronas de la lámina IX de las astas ventrales (Kow y cols. 1977).

Módulo del tallo cerebral

La información relacionada con la expresión de la CL y su intensidad son procesadas en el tallo cerebral, es por eso, que esta estructura es indispensable para que la hembra realice con éxito la CL durante la monta del macho (Modianos y Pfaff 1976). Las estructuras activadas durante la CL, en este módulo, son las áreas catecolaminérgicas A1 y A2, así como las neuronas caudales del núcleo del tracto solitario, el área tegmental ventral (Hubscher y Berkley 1994, Cameron y cols. 2004, Coria-Ávila y Pfaus 2007), el cerebelo (Paredes-Ramos y cols. 2011), así como el núcleo paragigantocelularis (Normandin y Murphy 2011a).

Módulo mesencefálico

En el módulo mesencefálico se localizan la formación reticular mesencefálica (FRM) y la sustancia gris periacueductal (PAG de sus siglas en inglés *periaqueductal gray*). Esta última es la estructura más estudiada del módulo mesencefálico, ya que en diversos estudios se ha encontrado que es activada durante la CL (Flanagan-Cato y cols. 2006, Normandin y Murphy 2011b). Además, la infusión de GnRH en la parte ventrolateral de ésta estructura induce la CL (Riskind y Moss 1983). La PAG se considera como un punto central de funciones del control motor y autonómico, ya que por un lado recibe proyecciones descendentes de diversas regiones límbicas y núcleos hipotalámicos, particularmente el HVM (Calizo y Flanagan-Cato 2002, Calizo y Flanagan-Cato 2003, Tupal y Faingold 2012), enviando proyecciones descendentes a otras áreas del tallo cerebral y la médula espinal relacionadas con la CL (VanderHorst y cols. 2004, Loyd y Murphy 2006, Gerrits y cols. 2009). Por otro lado, la lesión de la PAG provoca la pérdida inmediata de la CL en

ratas OVX pretratadas con estrógenos y progesterona (Corodimas y Morrell 1990). Sin embargo, la estimulación eléctrica de ésta induce la expresión de dicha conducta en ratas OVX pretratadas con 17- β estradiol (Pfaff y Sakuma 1979b).

Módulo diencefálico

En este módulo cerebral se localizan diversos núcleos involucrados en la inducción de la CL. Uno de ellos, y quizá el más importante, es el HVM (Pleim y Barfield 1988), ya que cuando se lesiona bilateralmente se disminuye la expresión de la CL tanto en ratas (Singer 1968, Malsbury y cols. 1977, Pfaff y Sakuma 1979a) como en hámsters (Malsbury y cols. 1977) con ciclos estrales normales. Por el contrario, la estimulación eléctrica del HVM induce la lordosis en ratas pretratadas con dosis bajas de BE (Pfaff y Sakuma 1979a). 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 disminución de la lordosis. Estudios inmunocitoquímicos y auto-radiográficos también han mostrado un papel esencial del HVM en la regulación de la CL, ya que las células de este núcleo poseen RE y RP (Pfaff y Sakuma 1979a), por lo que al administrar cantidades pequeñas de progesterona directamente en el HVM induce la expresión de la CL en ratas OVX pretratadas con BE (Blaustein y cols. 1987). Además, la estimulación del clítoris activa la porción dorsomedial del HVM (Parada y cols. 2010) mientras que las intromisiones que la hembra recibe por parte del macho activan el núcleo talámico subparafascicular parvocelular medial (Coolen y cols. 1996, Veening y Coolen 1998). Asimismo, se ha llegado a identificar diversas estructuras cerebrales que se activan después de que se produce la CL, como el núcleo arqueado (Erskine 1993, Parada y cols. 2010), el núcleo hipotalámico dorsomedial del hipotálamo (Erskine 1993, Tetel y cols. 1993), la región premamilar (Coolen y cols. 1996, Pfaus y cols. 1996), así como el núcleo hipotalámico paraventricular (parvo y magnocelular; Flanagan y cols. 1993, Yang y Voogt 2002, Cameron y Erskine 2003).

Otros centros nerviosos relacionados con la expresión de la CL en roedores han sido el área tegmental ventral (ATV) y el núcleo habenular, ya que al igual que en el HVM, los implantes de progesterona o progesterona conjugada con suero de albúmina en el ATV inducen la lordosis en el hámster y la rata (DeBold y Malsbury 1989, Frye y cols. 1996). Por otro lado, las lesiones del núcleo habenular reducen las conductas proceptivas y la receptividad en ratas OVX tratadas con BE (Rodgers y Law 1967, Modianos y cols. 1975).

Módulo del cerebro anterior

En esta región cerebral se localizan el APOm, el septum, el bulbo olfatorio, etc., áreas que se conoce que ejercen efectos inhibitorios sobre la CL, por ejemplo, la lesión en el APOm de la rata hembra adulta OVX induce la receptividad sexual (Malsbury y cols. 1981). Además, las hembras que han sido lesionadas en esta área requieren menor cantidad de estrógenos para mostrar CL que las hembras OVX que no han sido lesionadas (Singer 1968, Powers y Valenstein 1972).

Por otro lado, los estímulos eléctricos aplicados en esta área provocan una disminución de la CL y un aumento de las conductas de rechazo en ratas intactas u OVX previamente tratadas con BE y progesterona (Sakuma y Pfaff, 1979a). La utilización de técnicas de autorradiografía e inmunocitoquímica ha demostrado que las neuronas del APOm poseen RE y RP (Pfaff y Sakuma, 1979b), ya que implantes de 17- β estradiol en forma de cristales, directamente en esta área, restauran la CL en hembras OVX (Sakuma y Pfaff 1979b, Wilcox y cols. 1984). Además, este mismo efecto se manifiesta cuando la progesterona se administra en forma de cristales o disuelta en aceite dentro del APOm de ratas OVX pretratadas con inyecciones sc de BE (Rodríguez-Manzo y cols. 1986, Beyer y cols. 1988).

El septum y el bulbo olfatorio, también han sido áreas relacionadas con la disminución de la CL en diferentes especies de roedores. Por ejemplo, en la rata, el septum desempeña un efecto negativo en la CL probablemente al contrarrestar los efectos facilitatorios del HVM (Segovia y cols. 2009). Además, la lesión eléctrica de este núcleo induce la expresión de la CL en ratas pretratadas con BE (Tsukahara y Yamanouchi 2001, Tsukahara y Yamanouchi 2002, Tsukahara y cols. 2003, Xiao y cols. 2005, Segovia y cols. 2009), sin embargo, en el hámster provoca el efecto contrario, aparentemente por incrementar la sensibilidad a 17- β estradiol y progesterona (Nance y cols. 1974, Nance y cols. 1975). Por otro lado, la remoción del bulbo olfatorio en ratas OVX tratadas solo con BE (Moss, 1971) o con BE más progesterona (McGinnis y cols. 1978) provoca un incremento en el LQ.

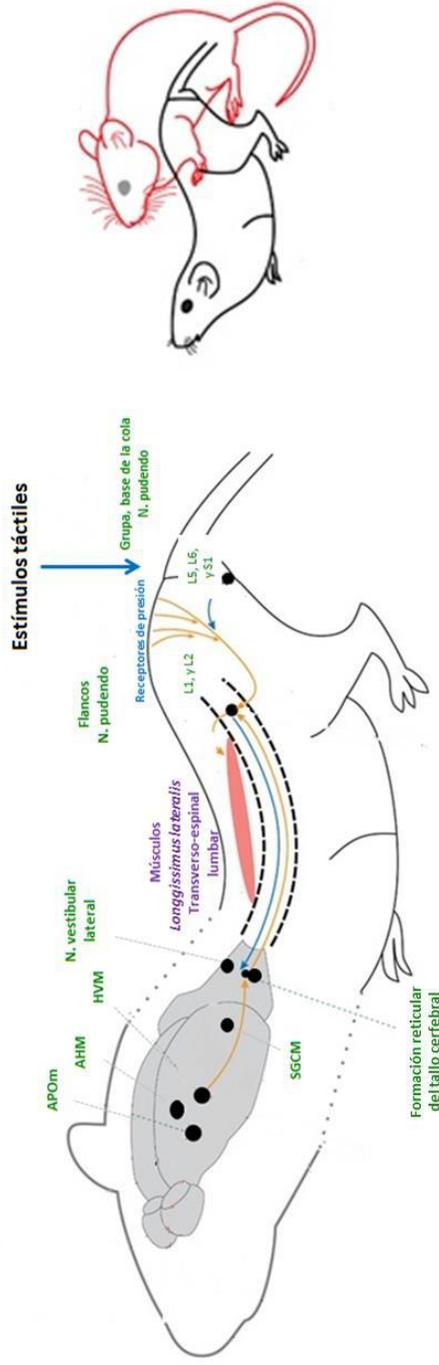


Figura 2. La conducta de lordosis se produce por la integración de las señales sensoriales que la hembra recibe por la monta del macho y las que se originan en el hipotálamo, particularmente en el HVM. Este circuito se activa cuando el macho monta a la hembra y le estimula sus flancos, la base de la cola y el periné. Esos estímulos activan receptores cutáneos de presión, que envían sus señales a la médula espinal; la señal generada en la piel de los flancos entra a la médula espinal a través de los ganglios de la raíz dorsal a los segmentos lumbares 1 y 2, mientras que las señales provenientes de los cuartos traseros, la base de la cola y del periné, lo hacen a través de los segmentos lumbares 5, 6 y sacro 1. Todas las señales provenientes de la periferia convergen en interneuronas sensibles a la presión, ubicadas en la sustancia gris del cuerno dorsal de la región lumbar de la médula espinal. Las señales que llegan a las interneuronas antes mencionadas, activan fibras ascendentes de la columna anterolateral de la médula espinal, las cuales arriban a la formación reticular del tallo cerebral, al núcleo vestibular lateral y a la sustancia gris central mesencefálica. Cabe señalar que de manera específica el HVM y el APOm por la acción del 17- β estradiol y la progesterona, mantienen una activación tónica sobre la sustancia gris central mesencefálica, la cual a su vez activa a la formación reticular del tallo cerebral (Pfaff, 1980; Pfaff y cols., 1994). Esta señalización descendente facilita la actividad de las motoneuronas responsables de producir la dorsiflexión de los músculos longissimus lateralis y transversoespinal lumbar; responsables de producir la dorsiflexión que caracteriza a la lordosis. HVM = núcleo hipotalámico ventromedial. AHM = área hipotalámica media, SGCM = sustancia gris central mesencefálica. N. vestibular lateral = núcleo vestibular lateral, N. pudendo = nervio pudendo. L = segmento lumbar de la médula espinal. S = segmento sacro de la médula espinal. → = columna anterolateral. → = vía descendente. Modificado de Wunsch 2014.

1.5. El receptor intracelular a progesterona

El RP es una proteína a través de la cual la progesterona ejerce la mayoría de sus efectos (Blaustein y Feder 1979, O'Malley y cols. 1991). Las primeras caracterizaciones, así como la distribución tisular de este receptor se realizaron mediante la utilización de la progestina sintética R5020 (17, 21-dimetil-19-nor-2,9-pregnandien-3-20 diona), la cual se disocia más lentamente del RP que la propia progesterona (Philibert y cols. 1977) y forma un complejo hormona-receptor más estable. Además, con el uso del ^3H R5020 también se detectó la presencia de RP citoplásmicos en diferentes órganos (Mobbs y Liu 1990, Boivin y cols. 1994) como; útero, hipófisis, hipotálamo, APOM, amígdala, corteza cerebral y mesencéfalo en diferentes especies de mamíferos (Moguilewsky y Raynaud 1979, MacLusky y McEwen 1980). Sin embargo, en el sistema nervioso central, el RP no sólo ha sido detectado en las neuronas, sino también en células gliales, principalmente en oligodendrocitos (Jung-Testas y cols. 1992). Se han caracterizado dos poblaciones del RP en el sistema nervioso central de roedores con el uso de técnicas bioquímicas e inmunocitoquímicas (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 (MacLusky y McEwen 1980, Camacho-Arroyo y cols. 1994) no modificada por 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 BE a cobayos OVX. Cabe también señalar que los estrógenos inducen la transcripción del RP en el útero, hipotálamo y corteza cerebral de la coneja adulta (Camacho-Arroyo y cols. 1994). Sin embargo, no existe una relación directa entre la expresión del gen y la síntesis del RP en respuesta a $17\text{-}\beta$ estradiol, lo cual sugiere la existencia de un control diferencial a nivel postranscripcional en diferentes tejidos (Shughrue y cols. 1997).

Inicialmente, se encontró que el RP ubicado en el citoplasma se unía a la progesterona, formando un complejo activo que 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-Appanat y cols. 1986, Mani y Portillo 2010).

Sin embargo, se ha observado la localización de RP en el núcleo como en el citoplasma en el hipotálamo (Blaustein y cols. 1988). Estos receptores citoplásmicos podrían explicar los efectos membranales de la progesterona en la CL (DeBold y Frye 1994).

Recientemente, en estudios *in vitro*, se ha encontrado que en ausencia de su ligando, la RP-A se encuentra en el núcleo, mientras que la RP-B se encuentra en el citoplasma (Leslie y cols. 2005).

1.5.1. Características estructurales y farmacológicas del receptor a progesterona

El RP comparte 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. 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 ADN 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 truncada 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 (Figura 3) 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 progesterona; 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 (HSP 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 el receptor, particularmente en los residuos de serina (posiciones 102, 294, 345) por diferentes proteínas cinasas, incluyendo la

MAPK (serina 294), la caseína cinasa II (ser 81) y la cinasa dependiente de ciclina (serina 25, 162, 190, 213, 400, 554, y 676; Lange, 2004, Hagan y cols. 2009). Actualmente se ha encontrado que la proteína cinasa C (PKC) también fosforila al RP en la serina 400 (González-Arenas y cols. 2015).

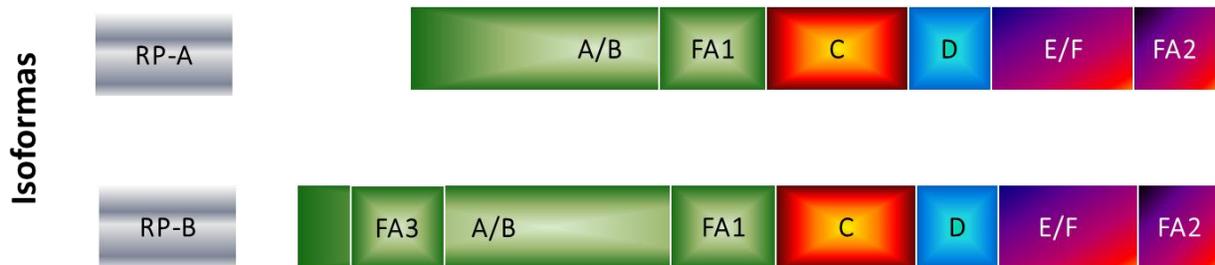


Figura 3. *Diferentes isoformas del receptor a progesterona (RP). La isoforma B contiene 164 aa más que la isoforma A. Además, en la B se encuentra un factor de activación (AF), que no se encuentra en la isoforma A. Modificado de Kastner y cols. 1990.*

Además, 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 (FA-2), la cual permite la interacción del RP con la maquinaria transcripcional. Otro dominio ha sido localizado en el extremo carboxilo terminal denominado función de activación 1 (FA-1) y otro en el extremo N-terminal denominado función de activación 3 (FA-3), solo presente en la RP- B. La FA-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 FA-3 puede funcionar de manera independiente o sinergizar con la activación o desactivación de la FA-1 y FA-2 (Horwitz y cols. 1996). La isoforma C no contiene el dominio N terminal, por lo que no contiene a la FA1, la FA3 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 deciduización del estroma uterino antes de la implantación (Mulac-Jericevic y cols. 2000). Además, inhibe la hiperplasia del útero inducida por 17- β estradiol, 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 HSP 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, HSP 90, HSP 57, y HSP 72 (Smith y cols. 1990), condición que hace que el receptor sea incapaz de unirse al ADN e inducir la transcripción de genes de respuesta a la progesterona. 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 progesterona 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 progesterona de manera independiente a la liberación de las HSP; 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 HSP, son capaces de interactuar con gran afinidad sobre elementos específicos que responden a la progesterona dentro de los sitios promotores en los genes blanco (Beato y Sánchez-Pacheco 1996).

1.5.2. El receptor a progesterona como una fosfoproteína

La fosforilación de proteínas consiste en la incorporación de grupos fosfato 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 (Figura 4; 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 en la célula (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 ubiquitine 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.

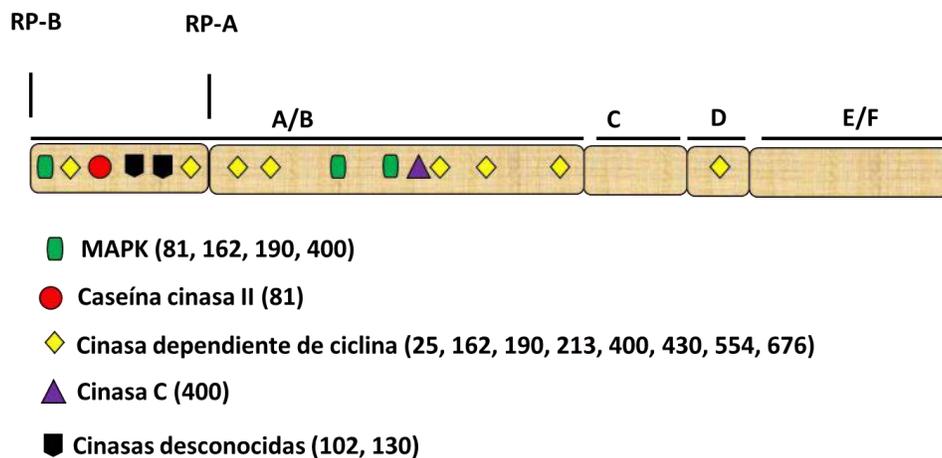


Figura 4. Sitios de fosforilación del RP. En la figura se muestran los diferentes sitios de fosforilación del RP por diferentes proteínas cinasas. Modificado de Lange 2004.

1.5.3. Correlación entre la concentración del receptor a progesterona y la expresión de la conducta de lordosis

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 CL 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 CL disparada por la inyección de progesterona (Parsons y cols. 1980, Ahdieh y cols. 1986). Así, Moguilewsky y Raynaud (1979) demostraron que, en ratas OVX tratadas con BE, los niveles máximos de CL inducida por la inyección de progesterona 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 CL en la rata. Así, en estudios realizados mediante la utilización del $^3\text{H}^3\text{R5020}$, como marcador de unión con el RP (Parsons y cols. 1982), se encontró que tanto el inicio como la desaparición de la CL inducida por progesterona coincidía con la aparición y desaparición del RP después del implante y la remoción de $17\text{-}\beta$ estradiol 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 CL inducida por progesterona en hembras de cobayos pretratadas con estrógenos. También se mostró que altas concentraciones de progesterona translocan los RP 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 CL inducida por progesterona (Blaustein, 1982).

La utilización de oligonucleótidos antisentido 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 del ARN mensajero que lleva la información que codifica para estos receptores, o bien utilizando oligonucleótidos dirigidos para bloquear la traducción del ARN para la síntesis del RP. Así, la inyección de estos compuestos directamente en el HVM de hembras OVX, disminuye significativamente la CL inducida por progesterona (Pollio y cols. 1993). Además, este oligonucleótido antisentido también fue muy efectivo en reducir la CL cuando se aplicó a las 12 pero no a las 24 horas después del pretratamiento con BE. Concomitantemente, las conductas proceptivas, que se ha propuesto que son fuertemente dependientes de progesterona, también fueron suprimidas (Pollio y cols. 1993).

Mani y cols. (1994), 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 ARNm para la síntesis de RP, encontrando que tanto la proceptividad como la receptividad inducidas por progesterona fueron disminuidas en animales tratados con oligonucleótidos antisentido. Sin embargo, los animales que recibieron el oligonucleótido sentido continuaron expresando CL normal. Esta última se refiere a la lordosis grado 2, la cual se caracteriza por que la hembra realiza la dorsiflexión de la columna vertebral, seguida por la elevación de la cabeza aproximadamente a un ángulo de 30° respecto al suelo, acompañada de una ligera extensión de las patas delanteras, la elevación de la grupa y un movimiento lateral de la cola.

Además, 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 CL inducida por progesterona y por las progestinas reducidas en el anillo A (5α -DHP y 5β , 3β -Pgl). Los resultados mostraron un efecto diferencial de la RP-B con respecto a la RP-A sobre la

expresión de la CL inducida por progesterona y sus metabolitos reducidos en el anillo A, ya que la administración de oligonucleótidos antisentido para la RP-B, disminuyeron la CL (Guerra-Araiza y cols. 2009).

1.5.4. Características estructurales y farmacológicas del RU486

El RU486 es un antagonista del RP con alta actividad antiglucoide (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 11β -(-4-dimetil-amino fenil)- 17β -hidroxi- 17α -(prop-1-inil)-estra-4-9-dien-3-ona, que no presenta el grupo metilo en el carbono 19 presente en la molécula de progesterona y glucocorticoides (Figura 5).

El RU486 muestra gran afinidad por el RP, impidiendo que ésta proteína inicie el proceso de transcripción (Baulieu 1991). Dicha antiprogestina es ampliamente utilizada para explorar la participación del RP sobre la expresión de la CL en roedores (Brown y Blaustein 1984, Beyer y cols. 1997, Carrillo-Martínez y cols. 2011, García-Juárez y cols. 2011).

1.5.4.1. Mecanismo de acción del antagonista RU486

El RU486, ejerce sus efectos antagónicos sobre el RP mediante los siguientes eventos: a) compete con la progesterona por unirse al RP, sin embargo, lo hace en sitios distintos 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 progesterona. A pesar de que el RU486 promueve la unión del RP a los elementos de respuesta a la progesterona tanto *in vitro* como *in vivo* no se ha encontrado que promueva la síntesis de proteínas de la misma manera en que lo hace la propia progesterona (Edwards y cols. 1993); c) alteración en la conformación del dominio de unión al ligando, el RU486 disminuye el reclutamiento de coactivadores en el extremo carboxilo terminal del RP. Este cambio de conformación inactiva a la FA-2 del RP y no permite su interacción con coactivadores (Oñate y cols. 1995).

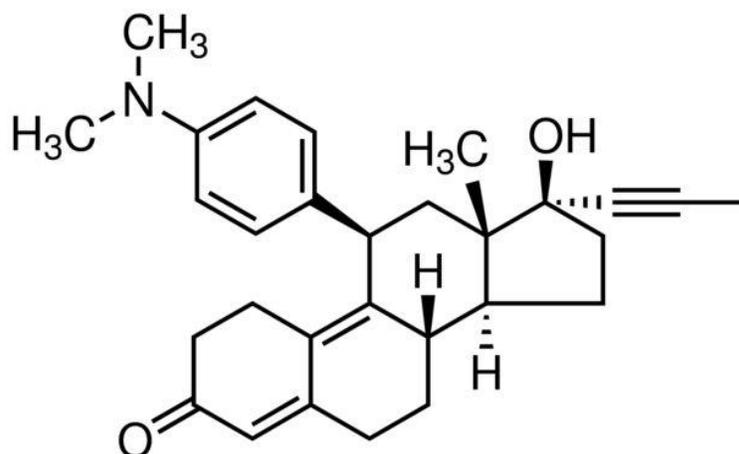


Figura 5. Estructura química del RU486. 17 β -hidroxi-11 β -(4-dimetil-aminofenil)-17 α -(prop-1-inil). Nótese que no presenta el grupo metilo en el carbono 19 (C19) presente en la molécula de progesterona.

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) disminuye la interacción de los dominios amino y carboxilo terminal del RP. La activación del RP requiere una acción sinérgica entre la FA-1 y la FA-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 FA-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.

1.6. Estrógenos

Los estrógenos, al igual que la progesterona, son hormonas que regulan una gran variedad de eventos fisiológicos que van desde la reproducción hasta funciones especializadas como la cognición y la memoria. Estos son hormonas esteroideas sintetizadas a partir del colesterol, y que en hembras de mamíferos en edad reproductiva son producidos principalmente por los ovarios, sin embargo, existen otras fuentes como lo son, el tejido adiposo, las glándulas suprarrenales, cerebro, piel, corazón, hígado, músculo y hueso (Cui y cols. 2013). Estas hormonas son sintetizadas por la

aromatización de testosterona y androstenediona [proceso catalizado por la aromatasa (una enzima que reduce el anillo A de la molécula de andrógenos en un anillo bencénico, además de eliminar el grupo metilo del carbono 10)] (García-Segura y cols. 1988, Azcoitia y cols. 2011). Esta última reacción química produce dos tipos de estrógenos; 17- β estradiol (el principal estrógeno circulante en la sangre) y estrona quienes al ser metabolizados en el hígado pueden ser convertidos a estriol.

1.6.1. Síntesis de estrógenos en los ovarios

La síntesis y secreción de estrógenos en los ovarios involucra el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. Este circuito es activado una vez que el hipotálamo secreta la GnRH, que al unirse a sus receptores ubicados en las células gonadotropas de la hipófisis induce la secreción de la FSH (Hillier y cols. 1994). Esta última hormona viaja a través del torrente circulatorio hasta las células de la granulosa, de los folículos ováricos en desarrollo, la cual, al unirse a sus receptores aumenta la actividad de la aromatasa e inhibina- α (un potente activador de la síntesis de andrógenos; Erickson y Hsueh 1978). Este aumento en la actividad de inhibina α provoca que las células de la teca interna en los folículos preovulatorios sintetizen andrógenos (Hillier y cols. 1991), hormonas que son transportadas hacia las células de la granulosa, donde por medio de la aromatasa son convertidas a 17- β estradiol y estrona.

1.6.2. Síntesis de estrógenos en el cerebro

La enzima de escisión de la cadena lateral de colesterol (P450_{scc}) es la única enzima que regula la conversión de colesterol a pregnanolona y ha sido identificada en áreas relacionadas con la reproducción como el hipocampo, hipotálamo, núcleo caudado, tálamo, cerebelo y amígdala. Además, se ha identificado en áreas no relacionadas con la reproducción como la corteza cerebral y tallo cerebral (Azcoitia y cols. 2011, Cui y cols. 2013). Bajo condiciones normales, las neuronas son la principal fuente de estrógenos en el cerebro, sin embargo, los astrocitos también sintetizan estrógenos ante un daño cerebral (Gatson y cols. 2011). En cambio, los oligodendrocitos y la microglía no producen estrógenos a partir del colesterol, a pesar de que expresen la 17- β HSD, que convierte la estrona a 17- β estradiol e hipotéticamente la androstenediona a testosterona (Gottfried-Blackmore y cols. 2008, Cui y cols. 2013).

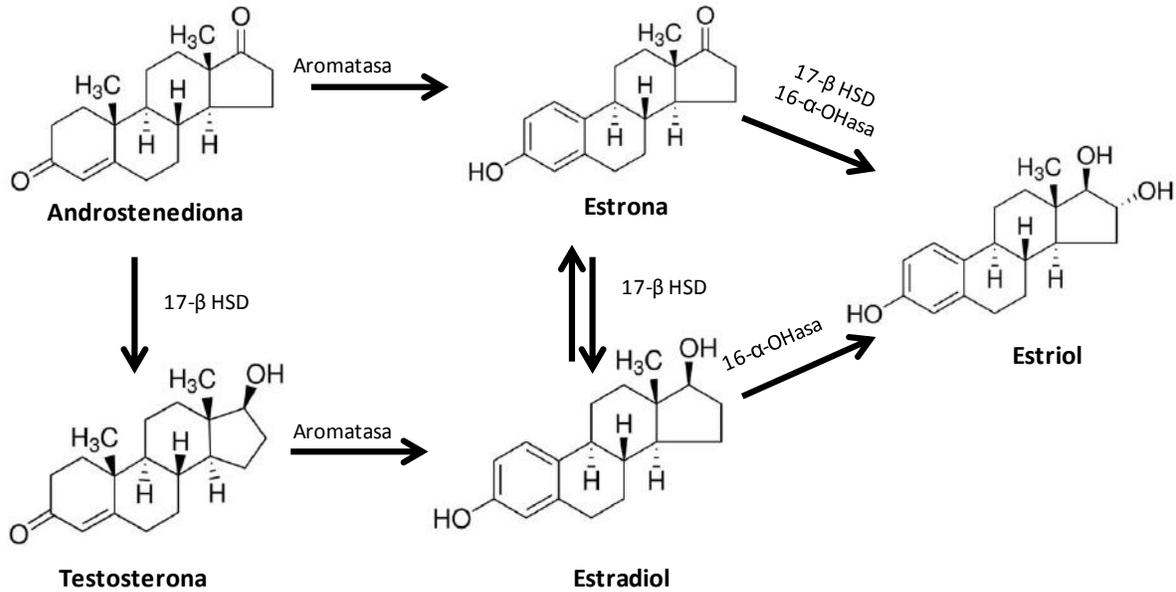


Figura 6. Síntesis de estrógenos a partir de andrógenos. 17-β HSD = 17β-hidroxiesteroide-deshidrogenasa. 16-α-OHasa = 16-α-hidroxilasa.

1.6.3. Inactivación de 17-β estradiol

La inactivación de 17-β estradiol (el estrógeno más potente y más abundante en hembras de mamíferos en edad reproductiva) se puede dar de dos maneras, una de ellas es por medio de su conversión a estrógenos menos activos como la estrona o el estriol o por conjugación. Así, en el hígado, las moléculas de 17-β estradiol sufren un proceso de oxidación catalizado por la enzima 17-β hidroxiesteroide-deshidrogenasa tipo II, proceso químico que convierte al 17-β estradiol en estrona (Peltoketo y cols. 1999). Además, tanto el 17-β estradiol (por medio de la enzima 16α-hidroxilasa) como la estrona (por la acción de la 17-β hidroxiesteroide-deshidrogenasa tipo II y la 16α-hidroxilasa) son transformados a estriol (Figura 6; Azcoitia y cols. 2011).

La otra vía de inactivación está dada por la adición de ácido glucorónico o por la adición de grupos sulfuro a la molécula de 17-β estradiol, los cuales no puede interactuar con los RE (Kotov y cols. 1999). Por lo tanto, la cantidad de estrógenos circulantes puede indicar un metabolismo dinámico entre la síntesis y la inactivación de 17-β estradiol.

1.6.4. Receptores a estrógenos

Los RE pertenecen a la superfamilia de receptores a esteroides, cuya estructura modular presenta diferentes dominios funcionales; por ejemplo: 1) el dominio A/B ubicado en el extremo N-terminal

(aminoácidos 1 a 180) de la molécula, sobre el cual se encuentra la función de activación 1 (FA-1). En esta región se llevan a cabo las interacciones proteína-proteína y la transactivación; 2) un dominio C (aminoácidos 181 al 263), también conocido como dominio de unión al ADN, que incluye a los dedos de zinc, responsables de la dimerización y unión del receptor al ADN; 3) el dominio D (aminoácidos 264 a 302) conocido como la región de la bisagra, este dominio permite el plegamiento del receptor, además de ser un sitio de fosforilación; 4) dominio E/F localizado en el extremo C-terminal (aminoácidos 303 a 552 y 553 a 595 respectivamente) conocido como dominio de unión al ligando. Además, en el dominio E se encuentra una segunda función de activación (FA-2), dentro de las funciones de este dominio no solo se encuentra la unión al ligando, sino también es un sitio de interacción para los co-activadores o co-represores. El dominio F ocupa los últimos aminoácidos de la molécula (45 para el RE- α y 30 para el RE- β) donde se lleva a cabo la formación de dímeros (Skafar y Koide 2006, Yang y cols. 2008, Ellmann y cols. 2009).

1.6.4.1. Receptores α y β a estrógenos

Los RE α y β (Figura 7) median los efectos de los estrógenos y por lo tanto participan en diferentes procesos fisiológicos y celulares. Se han identificado dos subtipos de RE conocidos como receptor alfa (RE- α ; Kuiper y cols. 1996), y receptor β (RE- β ; Tremblay y cols. 1997). Estos son producto de dos genes distintos localizados en los cromosomas 6 y 14, los cuales codifican para dos proteínas distintas. El RE- β (530 aminoácidos) es estructuralmente más corto que el RE- α , el cual contiene 595 aminoácidos (Kuiper y cols. 1996, Tremblay y cols. 1997). La región más homóloga entre el RE- α y el RE- β es el dominio C (dominio de unión al ADN; 95%), mientras que los dominios A/B, D y E/F son los menos conservados. Su estructura menos homóloga se encuentra en el dominio de unión al ligando (homología del 53%), sugiriendo que estos subtipos pueden desempeñar un papel diferencial a nivel fisiológico, por ejemplo, ciertos ligandos son agonistas selectivos del RE- β , tales como el fitoestrógeno genisteína (Strissel y Strick 2005, Ellmann y cols. 2009). Además, el RE- β carece de una gran porción en el extremo C-terminal (dominio F; Skafar y Koide 2006, Yang y cols. 2008), una región conocida por ser importante en las acciones agonistas del tamoxifén, un modulador selectivo de los receptores a estrógenos (Norman y cols. 2004).

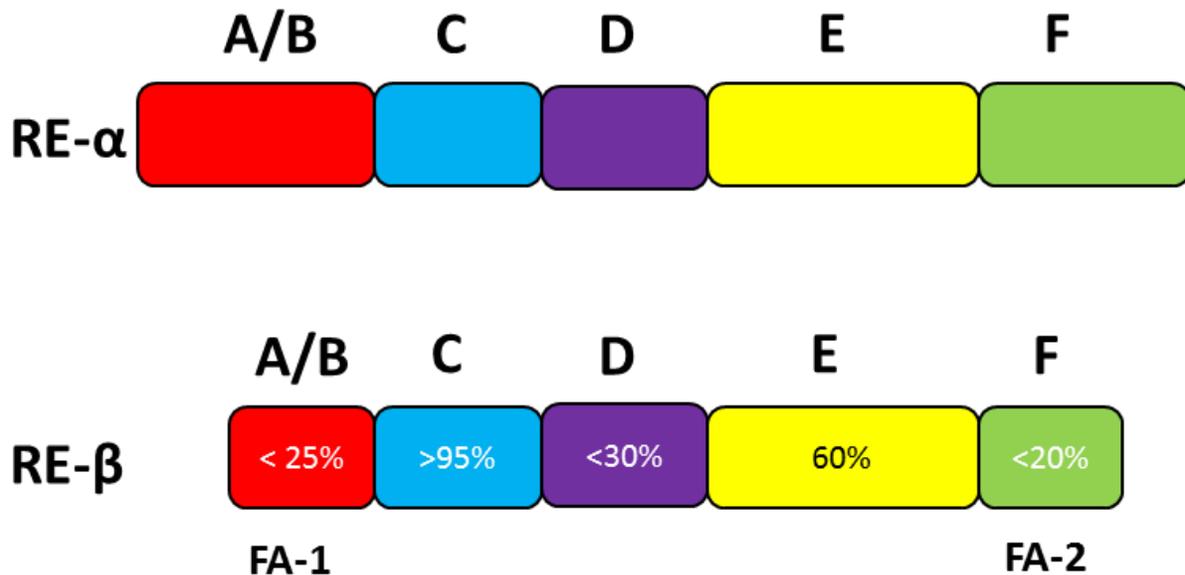


Figura 7. Receptores a estrógenos intracelulares. La figura muestra el porcentaje de homología entre los dos receptores. Modificado de Compston 2001.

1.6.4.2. Localización de los receptores a estrógenos en el cerebro

Los receptores a estrógenos fueron localizados, inicialmente, en el cerebro por medio de técnicas autorradiográficas, así, en esos experimentos, las ratas eran inyectadas con 17- β estradiol marcado radioactivamente ($^3\text{H-E}_2$ o $^{125}\text{I-E}_2$), encontrándose que esta hormona se acumulaba en células dentro del hipotálamo y sistema límbico (Pfaff y Keiner 1973), como, la amígdala medial, núcleo base de la estría terminal, APOm, núcleo arqueado, HVM, PAG y núcleo vestibular. Posteriormente, con la clonación de los RE- α y RE- β se logró sistematizar la distribución de estos receptores, es decir, se encontró que la distribución del ARN mensajero (ARNm) del RE- α o su proteína se expresa densamente en núcleo base de la estría terminal, núcleo cortical de la amígdala, APOm, núcleo periventricular, núcleo arqueado, HVM, parte ventral del septum lateral y PAG (Merchenthaler y cols. 2004). En cambio, el ARNm del RE- β se encontró altamente expresado en el núcleo paraventricular, supraóptico, la isocorteza, núcleo accesorio olfatorio, porción anterodorsal del núcleo preóptico y el cerebelo (Merchenthaler y cols. 2004). Además, el RE- β (la proteína) es abundante en el APOm, en el núcleo base de la estría terminal, amígdala, HVM, PAG y ATV.

Por otro lado, los RE- α y RE- β se encuentran co-expresados altamente en sistema límbico (tálamo, hipotálamo, hipocampo, amígdala cerebral, el núcleo amigdaloides medial y cortical,

cuerpos mamilares, cuerpo calloso, septo y mesencéfalo), núcleo base de la estría terminal, APOm, núcleo supraquiasmático y habénula (Vida y cols. 2008). Sin embargo, los patrones de distribución no se traslapan completamente, de modo que algunas regiones solo expresan RE- α , por ejemplo, en el HVM y el órgano subfornical, mientras, que en neuronas del bulbo olfatorio, núcleo supraóptico, núcleo paraventricular y el cerebelo expresan exclusivamente RE- β (Vida y cols. 2008).

1.6.4.3. Regulación de los receptores a estrógenos intracelulares

Los estrógenos regulan la población de sus receptores intracelulares a nivel transcripcional, postranscripcional o por medio de su degradación. Actualmente, se conoce que los estrógenos regulan la cantidad del ARNm que codifica para la síntesis de sus receptores a través de las diferentes fases del ciclo estral de la rata. Por ejemplo, en el APOm se encuentran los niveles más altos de estos receptores durante el estro y el metaestro, disminuyendo en el diestro y aún niveles más bajos han sido detectados en el proestro (Shughrue y cols. 1992).

A nivel de proteína y con el uso de técnicas de inmunoreactividad, se ha encontrado que los estrógenos regulan la disminución del RE- α y RE- β extranucleares, lo que coincide con la disminución de ARNm (Lauber y cols. 1991). Además, el tratamiento con 17- β estradiol por 20 minutos a ratas y cobayos OVX, disminuye la cantidad de RE citoplasmáticos (Blaustein 1992).

Por otro lado, la degradación de proteínas desempeña un papel fundamental en la regulación de los RE por su ligando, ya que se ha encontrado que cultivos celulares con tratamientos agudos o crónicos de 17- β estradiol induce una pérdida de 50 a 60% del RE- α , aún en presencia de inhibidores de síntesis de proteínas (Alarid y cols. 1999). Además, de manera transitoria, el 17- β estradiol incrementa la ubiquitinación de los RE intracelulares (Nirmala y Thampan 1995).

Trabajos realizados en el área de la conducta sexual femenina muestran que la unión de 17- β estradiol a sus receptores, y por consecuencia este patrón motor, aumentan en presencia de inhibidores de la vía de los proteosomas (Alarid y cols. 1999). Lo que sugiere que los proteosomas están involucrados en el mantenimiento de los niveles de RE en el cerebro y posiblemente involucrados en la regulación de las respuestas tisulares a 17- β estradiol.

1.6.5. Algunos eventos fisiológicos regulados por estrógenos

Los estrógenos regulan diversos procesos fisiológicos, entre ellos, la reproducción, el crecimiento del hueso, el balance energético, el sistema cardiovascular, la temperatura, la neuroprotección, el aprendizaje y la memoria.

Trabajos realizados en mamíferos, sugieren que los estrógenos al llegar al hipotálamo activan la maquinaria enzimática para sintetizar neuroprogesterona, la cual es necesaria para que se lleve a cabo la retroalimentación positiva por 17- β estradiol que provocará un pico de LH (Micevych y cols. 2009). Por lo tanto, se les ha relacionado con los eventos fisiológicos que llevan al inicio de la pubertad, así como el desarrollo de las características sexuales secundarias. Es decir, éstos estimulan el crecimiento y desarrollo de la vagina, útero, trompas de Falopio, así como el aumento de volumen de la glándula mamaria. Incluso, en humanos, se les ha relacionado con el crecimiento del vello axilar y púbico. Durante el primer trimestre del embarazo, se ha encontrado que éstos inducen la pigmentación de la región genital y la hiperpigmentación regional de los pezones y areolas (Loose y Stancel 2007).

Desde el inicio y hasta la mitad de la pubertad, los estrógenos estimulan el eje hormona del crecimiento-factor de crecimiento dependiente de insulina tipo 1, siendo el principal mediador del crecimiento lineal y del aumento del tamaño del cuerpo (Loose y Stancel 2007).

En el sistema nervioso central, los estrógenos producen cambios estructurales (a nivel de espinas dendríticas) y regulan algunas funciones. Así, en el hipocampo mejoran la cognición, la memoria y el aprendizaje. En la corteza del cíngulo y la sustancia nigra desempeñan funciones de neuroprotección (Quesada y cols. 2008), mientras que en la PAG modulan la sensibilidad al dolor (Loyd y Murphy 2008).

Uno de los efectos que actualmente están siendo muy estudiados es el papel de los estrógenos sobre las funciones cognitivas que muestran un impacto significativo en procesos relacionados con la plasticidad neuronal, ya que algunos estudios han mostrado que el 17- β estradiol en el sistema nervioso central puede modular la actividad de diversos sistemas de neurotransmisores, incluyendo al dopaminérgico, colinérgico, adrenérgico y serotoninérgico (Luine 1985, McEwen y Alves 1999, Sellix y cols. 2004).

Respecto a su papel que juegan sobre la regulación en la conducta sexual y la reproducción en hembras, se sabe que el 17- β estradiol producido en el ovario, sensibiliza diferentes áreas cerebrales, por ejemplo; al hipotálamo, en donde activa a los circuitos que regulan la ovulación ya

que induce la liberación de la GnRH (Herbison y Pape 2001, Micevych y cols. 2009, Micevych y Kelly 2012) la cual se conoce que tiene la capacidad de inducir la expresión de la CL, así como la liberación de gonadotropinas que a su vez provocan la ovulación (González-Mariscal y Beyer 1988).

1.6.6. Tamoxifén

El tamoxifén, [*trans l-(4-β-dimethylaminoethoxyphenyl)-l,2,-diphenyl but-1-ene*], es un compuesto no esteroideo derivado del trifeniletileno (Figura 8; Adam y cols. 1980) que debido a sus propiedades agonistas y antagonistas competitivas sobre los RE es conocido como un modulador selectivo de los receptores de estrógenos (MSRE), debido a que puede actuar de manera diferente dependiendo del órgano blanco. La identificación de sus propiedades antiestrogénicas se basa en la inhibición de la cornificación vaginal o los cambios en el peso uterino inducidos por 17-β estradiol en hembras OVX de ratones y ratas maduras infértiles (Harper y Walpole 1967) o en estudios sobre la CL (Etgen 1979, Etgen y Shamamian 1986, Meisel y cols. 1987, Lima-Hernández y cols. 2014).

La modulación selectiva del tamoxifén inicia con la unión de este compuesto a los RE, lo cual permite la dimerización del receptor, así como la unión del complejo hormona-receptor a los elementos de respuesta a estrógenos presentes en algunos genes. El efecto antiestrogénico se lleva a cabo a través de la inhibición de la actividad de la función de activación 2 (FA-2), pero no de la función de activación 1 (FA-1), la cual se mantiene activa (Katzenellenbogen y cols. 1977, McInerney y Katzenellenbogen 1996). Este mecanismo es, en principio, la razón de su actividad como agonista/antagonista; sin embargo, recientemente se describió una tercera función de activación llamada FA-2a, la cual puede funcionar cuando FA-1 y FA-2 están inactivas (Norris y cols. 1997). Además de esto, y para hacer más complejo este mecanismo, hay evidencias que sugieren que el tamoxifén se une de manera diferente a las FA, dependiendo de la concentración del fármaco, siendo la FA-2 la de mayor afinidad. Un ejemplo de ello es el efecto antiestrogénico parcial del tamoxifén, cuya acción a bajas concentraciones se lleva a cabo a través del bloqueo de la FA-2, en tanto que a concentraciones altas inhibe totalmente la acción de los RE, bloqueando tanto la FA-1 como la FA-2 (Hedden y cols. 1995).

La actividad diferencial que presenta el tamoxifén podría deberse a los co-reguladores que activa, los cuales pueden determinar la dirección de la transcripción iniciada por los RE ocupados

por este compuesto (Gee y cols. 1999), es decir, de los co-activadores que sólo se unen a los RE cuando se encuentra unido a un agonista (Gee y cols. 1999) y de los correguladores selectivos que potencian el antagonismo de los antiestrógenos e inhiben la activación transcripcional inducida por 17- β estradiol (Takimoto y cols. 1999). Algunas evidencias experimentales muestran que la acción del tamoxifén varía dependiendo de su unión con el RE- α o con el RE- β , o también del tipo de secuencia nucleotídica de los elementos de respuesta a estrógenos. Por ejemplo, Barkhem (1998) demostró que el tamoxifén ejerce sus efectos agonistas sobre los elementos de respuesta a estrógenos a través del RE- α , pero no con el RE- β (Barkhem y cols. 1998) y que tanto el tamoxifén como el 17- β estradiol actúan como activadores de la transcripción a través de los sitios AP-1, a través del RE- α , pero no con el RE- β (Paech y cols. 1997).

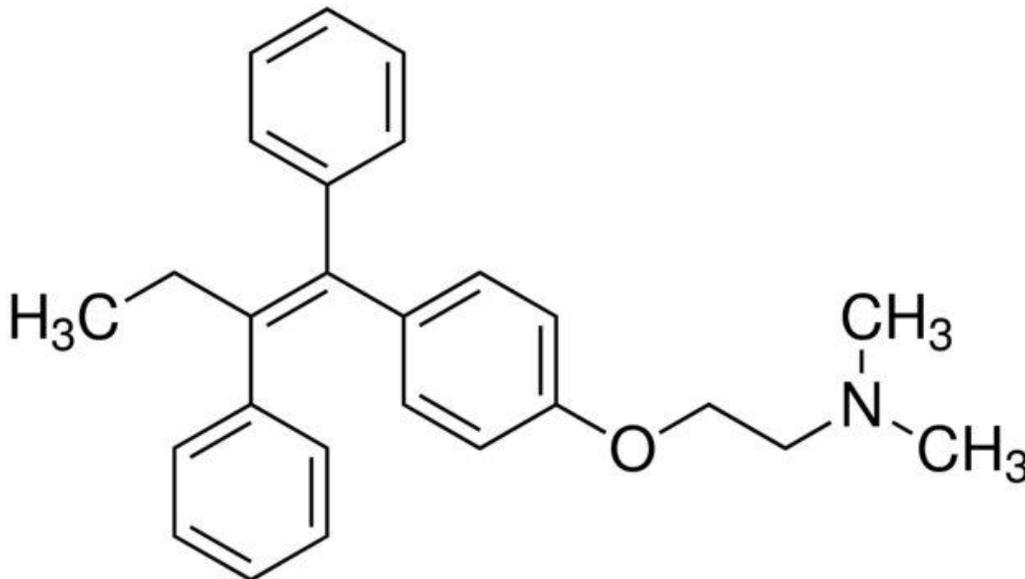


Figura 8. Estructura química del tamoxifén.

1.7. Fosforilación de proteínas

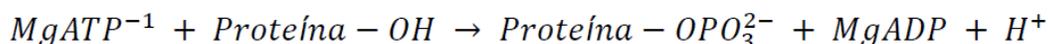
La fosforilación de proteínas es un mecanismo a través del cual la función celular es regulada ante estímulos extracelulares (Han y Martinage 1992). Los diferentes tipos de señales inducidos por neurotransmisores, hormonas, factores neurotróficos y citocinas, producen muchos de sus efectos fisiológicos al activar señales intracelulares que inducen la fosforilación de proteínas específicas en sus células blanco (Nestler y Greengard 1999).

Este evento se inicia con la unión de un primer mensajero, por ejemplo, hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores, con su respectivo receptor ubicado en la membrana celular que se encuentra acoplado a una molécula traductora llamada proteína G. Esta proteína, en su estado inactivo, se encuentra unida a varias subunidades; α , β y γ . La proteína es activada cuando se recibe una primera señal desde el receptor membranal que provoca que el GTP intracelular reemplace a una molécula de GDP, la cual se encuentra unida a la subunidad α de dicha proteína G que a su vez estimula a una proteína amplificadora, denominada adenilato ciclasa o bien, en otra vía de señalización se puede activar la guanilato ciclasa. La estimulación de estas enzimas perdura hasta que el GTP es hidrolizado a GDP, provocando la desactivación de la proteína.

La formación de los segundos mensajeros se lleva a cabo a través de la activación de esas proteínas amplificadoras, por lo tanto, la síntesis de AMPc o de GMPc, es realizada por la adenilato ciclasa, así como, por la guanilato ciclasa respectivamente. Finalmente, la unión de los segundos mensajeros a proteínas denominadas cinasas, provoca su activación y por ende la fosforilación de proteínas, ya que estas cinasas adicionan grupos fosfato a la proteína en cuestión (provocando un cambio conformacional) y con ello incrementan su actividad celular ya que proporcionan energía a la molécula fosforilada. De esta manera, el aumento en la concentración de AMPc o GMPc inducido por el primer mensajero, desencadena las respuestas celulares (Nestler y Duman 1994, Nestler y Greengard 1999).

1.7.1. Proteínas cinasas

Las proteínas cinasas en el humano son sintetizadas por 518 genes, haciéndolo el grupo de genes más abundante del genoma (Manning y cols. 2002). Estas enzimas catalizan la siguiente reacción:



Esta reacción nos muestra que la cinasa cataliza la transferencia de un fosfato proveniente del ATP al hidroxilo de un aminoácido en la proteína, con la subsecuente liberación de ADP e H^+ . $MgATP^{-1}$ = al ATP unido a un magnesio (brinda estabilidad entre los grupos fosfato que integran al ATP). OH = grupo hidroxilo unido a un aminoácido. OPO_3^{2-} = grupo fosfato transferido desde el ATP al aminoácido. $MgADP$, = ADP unido a un magnesio. H^+ = hidrógeno.

Las proteínas cinasas se clasifican de acuerdo con el sustrato que fosforilan; la mayoría (>95%) lo hace sobre residuos de serina, una pequeña cantidad (3-4%) sobre residuos de treonina

y muy pocas (<1%) sobre residuos de tirosina. En todos los casos, la cinasa cataliza la transferencia del grupo fosfato terminal (γ) del ATP o GTP a la porción hidroxilo del aminoácido correspondiente en la proteína blanco (Nestler y Greengard 1999). Sin embargo, no todas las cinasas fosforilan a un solo aminoácido, como el caso de las proteínas cinasas que activan proteínas cinasas para fosforilar residuos de serina y treonina que comprenden a un total de 385 miembros. Las cinasas que fosforilan residuos de tirosina son menos abundantes, habiendo un total de 90 miembros; sin embargo, las menos abundantes son aquellas cinasas duales que fosforilan residuos de tirosina y treonina, ya que de éstas tan sólo se han identificado 43 miembros (Roskoski 2010). A través de la fosforilación, las proteínas cinasas pueden controlar la actividad enzimática intracelular, la interacción con otras proteínas y moléculas, su localización en la célula y su propensión para ser hidrolizadas por proteasas (Johnson y Lapadat 2002).

1.7.2. Proteínas fosfatasas

Estas proteínas remueven grupos fosfato de los residuos de serina, treonina o tirosina de las proteínas; es decir, defosforilan proteínas. Por lo tanto, desempeñan un papel muy importante en la regulación de la actividad celular.

Las proteínas fosfatasas pueden ser activadas directamente por un segundo mensajero o una proteína cinasa y su regulación depende de inhibidores específicos (Nestler y Greengard 1999).

1.7.3. Fosfoproteínas

Las fosfoproteínas son aquellas proteínas que pueden cambiar su conformación al ser fosforiladas por las proteínas cinasas o defosforiladas por las fosfatasas. Estas reacciones inducen cambios en las propiedades de la proteína para convertirse en sustrato de otra proteína cinasa o fosfatasa o para participar en la activación de diversas respuestas fisiológicas (Nestler y Greengard 1999). La identidad de las fosfoproteínas puede ser muy variada, ya que incluyen factores de transcripción, canales iónicos, receptores para neurotransmisores, proteínas que regulan los niveles celulares de segundos mensajeros; así como inhibidores de proteínas fosfatasas (Nestler y Greengard 1999) o bien receptores a esteroides como el RP (Kato y Onouchi 1977).

A continuación se describen las principales características de las proteínas cinasas de interés para el desarrollo del presente trabajo.

1.7.4. Proteína cinasa A

Actualmente se conocen dos isoformas de la proteína cinasa A (PKA; I y II), las cuales difieren en su patrón de expresión y localización celular (Taylor y cols. 2012), actualmente se ha propuesto que la PKA I se encuentra en el citoplasma mientras que la PKA tipo II está asociada a la membrana celular. Estructuralmente, esta proteína es una cinasa bilobular, es decir, se encuentra formada por dos subunidades catalíticas unidas a dos subunidades reguladoras (Taylor y cols. 2012).

Dicha enzima existe en un estado basal y es activada únicamente ante el incremento en la concentración del AMPc (Figura 9). El incremento de este nucleótido cíclico provoca la unión de dos moléculas de AMPc a cada una de las subunidades reguladoras (Beebe y cols. 1984), dando como resultado un cambio conformacional que libera a las dos subunidades catalíticas (Welch y cols. 2010). Una vez liberadas, éstas se encargan de transferir grupos fosfato desde el trifosfato de adenosina (ATP) a una gran cantidad de proteínas sustrato (Hunter 2000), específicamente en los residuos de serina y treonina (Tasken y Aandahl 2004).

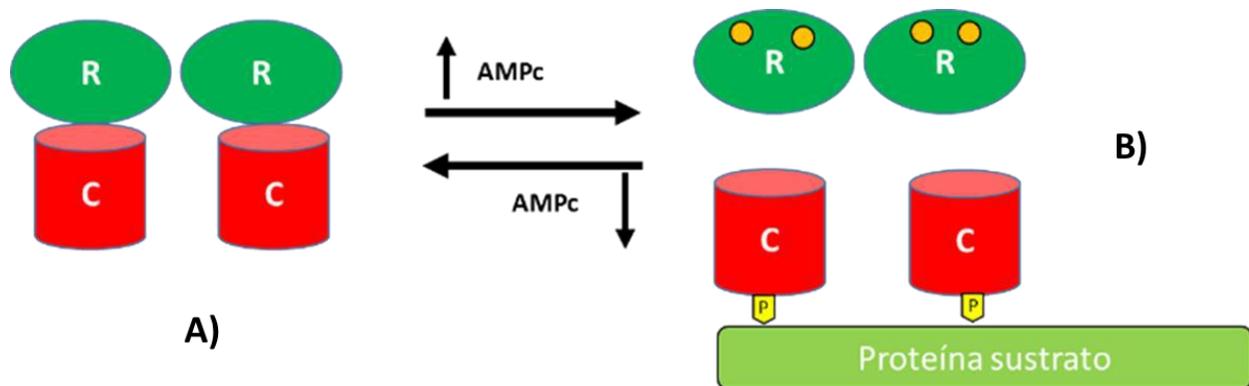


Figura 9. Activación de la proteína cinasa A por su ligando. A bajas concentraciones de AMPc la proteína cinasa A se encuentra como un tetrámero intracelular inactivo (A). El incremento en las concentraciones de AMPc, seguido por la unión del nucleótido a las subunidades reguladoras (R) produce un cambio conformacional en estas subunidades, que permite la liberación de las subunidades catalíticas (C) activas (B). Modificado de Lodish 2005.

1.7.5. Proteína cinasa G

La proteína cinasa G (PKG) es una proteína serina-treonina cinasa (Kuo y Greengard 1969, Busch y cols. 2013), de la cual se conocen dos isoformas: la tipo I, con un extremo N terminal acetilado,

usualmente encontrada en el citoplasma; y la tipo II, con un extremo N-terminal miristolado, asociada a la membrana celular (Wernet y cols. 1989, Uhler 1993).

Esta cinasa se encuentra constituida por dos monómeros idénticos. Cada monómero de PKG contiene un dominio regulador, un dominio autoinhibitorio y un dominio catalítico (Monken y Gill 1980, Francis y cols. 2010, Busch y cols. 2013). Esta proteína, en estado basal se encuentra inactiva, sin embargo, el incremento de GMPc provoca su activación (Figura 10). En términos moleculares, la unión de dos moléculas de GMPc a cada dominio regulador provoca la autofosforilación de los dominios autoinhibitorios de cada monómero, lo que permite que los dominios catalíticos (activos) transfieran grupos fosfato procedentes del ATP a los residuos de serina y treonina de sus proteínas blanco (canales iónicos, receptores y enzimas que controlan las concentraciones de calcio intracelular; Francis y Corbin 1999, Sausbier y cols. 2000, Yuasa y cols. 2000).

1.7.6. Proteína cinasa Src

La proteína cinasa Src (Src), es una cinasa que forma parte de la familia de las tirosina cinasas que regulan respuestas celulares ante estímulos extracelulares. Ésta es una proteína de 60 kDa (Hunter y Sefton 1980, Ohnishi y cols. 2011), que a su vez es fosforilada sobre residuos de tirosina y está relacionada con la regulación del crecimiento y diferenciación celular (Ushiro y Cohen 1980, Roskoski 2015). Esta proteína se expresa abundantemente en todas las células de los vertebrados, no obstante, en el cerebro se expresa de 5 - 200 veces más que en otros órganos. Por lo tanto, la expresión de altos niveles de esta proteína en las neuronas indica un posible papel en otros procesos diferentes a la división celular.

La estructura de la enzima muestra dos dominios, conocidos como SH2 y SH3 en el extremo N-terminal, que median la interacción de la enzima con otras proteínas; mientras que tanto el dominio catalítico como el dominio regulador se ubican en el extremo C-terminal (Figura 11). En estado basal, el dominio SH2 interactúa con tirosinas fosforiladas (Roussel y cols. 1991), lo que conduce a una interacción intramolecular entre el dominio SH2 y la tirosina fosforilada 527 del carboxilo terminal, mientras que el dominio SH3 interactúa con una secuencia rica en prolina en la hélice II de la molécula, localizada entre el dominio SH2 y el dominio catalítico, lo que mantiene a la molécula en un estado inactivo (Sicheri y cols. 1997, Xu y cols. 1997).

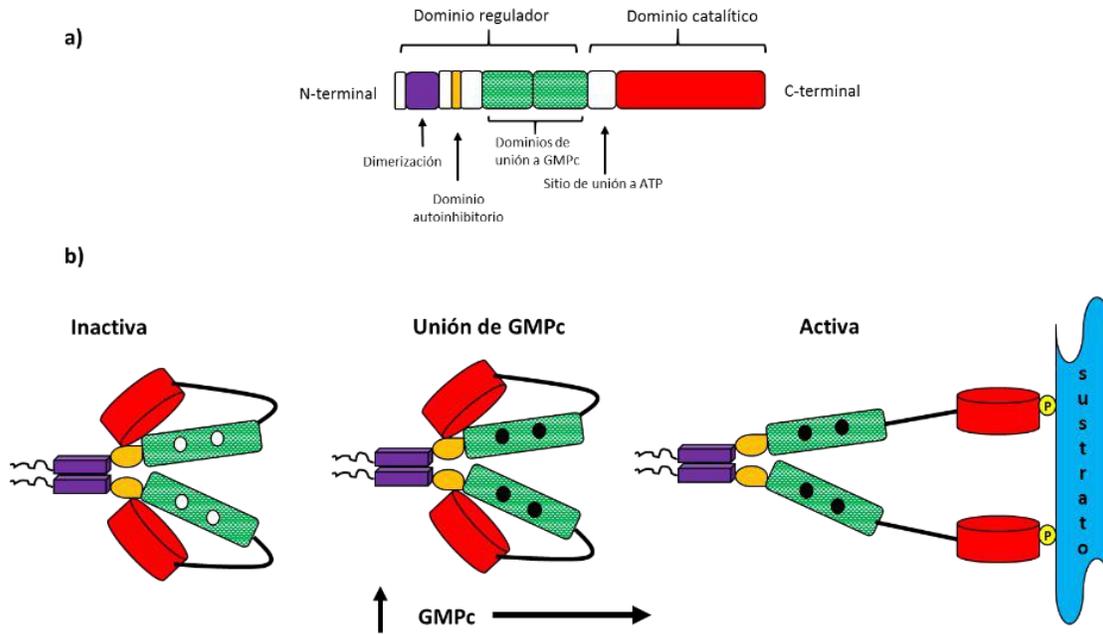


Figura 10. (a) Modelo estructural de la PKG, la figura muestra los diferentes dominios que constituyen a la cinasa G. (b) Activación de la cinasa G, la activación de esta cinasa ocurre cuando cuatro moléculas de GMPC se unen a los dominios de unión al nucleotido cíclico. Este evento induce un cambio conformacional en la proteína que provoca que el dominio autoinhibitorio libere al dominio catalítico de la cinasa para que esta transfiera grupos fosforilo a la proteína sustrato. Modificado de Vaandrager y cols. 2005.

La activación de esta cinasa ocurre mediante los siguientes eventos: (1) la unión de un ligando con una tirosina fosforilada (RE; Migliaccio y cols. 1998), al dominio SH2, (2) la unión de otro ligando con una secuencia rica en prolinas al dominio SH3 (RP; Boonyaratanakornkit y cols. 2001), (3) la autofosforilación de la enzima en la tirosina 416 (Ushiro y Cohen 1980, Ohnishi y cols. 2011) y su defosforilación en la tirosina 527, ya que como se mencionó, la fosforilación de la tirosina 527 resulta en la inactividad de la cinasa (Piwnica-Worms y cols. 1987), con la consecuente (4) fosforilación de la tirosina 416 (Figura 11).

Estos eventos liberan el dominio de cinasa de la molécula, lo que le permite que transfiera grupos fosfato del ATP a sustratos localizados en el citoplasma o en las cercanías de la membrana celular, provocando un cambio en la conformación y en la función de los sustratos fosforilados, lo que provoca una cascada de señalización, como la vía de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK; Abram y Courtneidge 2000).

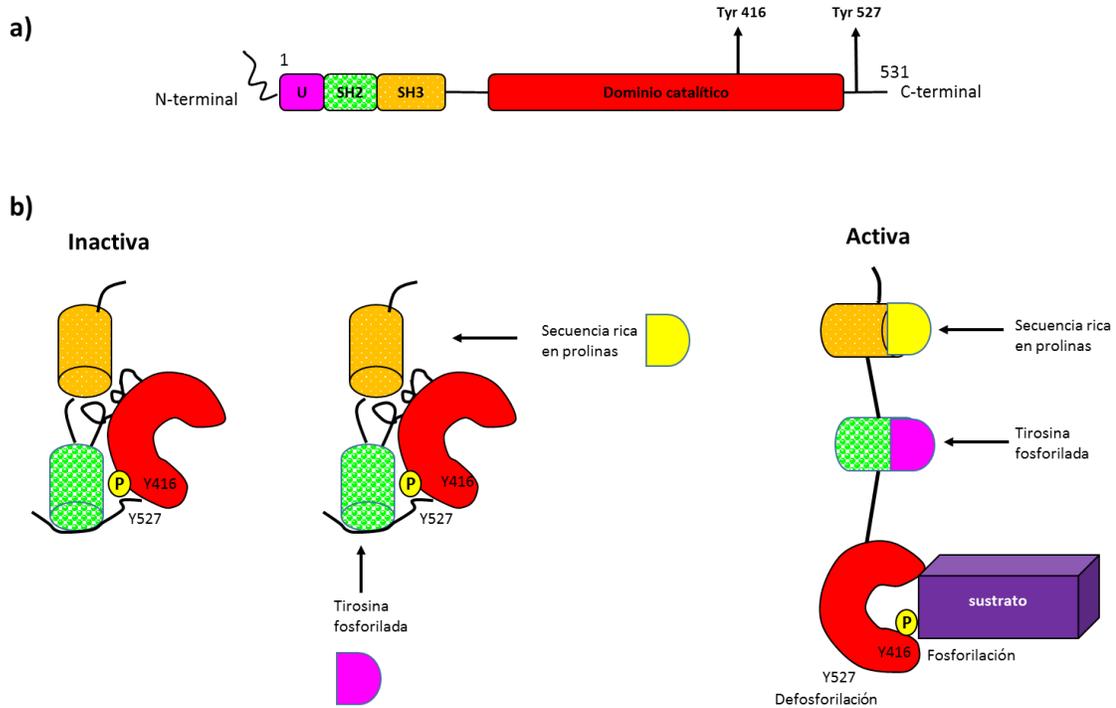


Figura 11. Activación de la cinasa Src. En el panel A se muestra la conformación inactiva de la cinasa Src, en la cual la tirosina 527 interactúa con el dominio SH2, el dominio SH3 interactúa con una secuencia rica en prolina localizada entre el dominio SH2 y el dominio catalítico. En B se muestran los dominios que sufren cambios para la activación de la cinasa y en C se muestra la conformación abierta o activa de la cinasa. Modificado de Martin 2001.

1.7.8. Proteína cinasa activada por mitógeno

La MAPK pertenece a una familia de proteínas cinasas cuya función y regulación han sido conservadas durante la evolución, desde organismos unicelulares hasta pluricelulares, como los humanos (Widmann y cols. 1999). Ésta regula diferentes eventos celulares como; la actividad celular, expresión genética, mitosis, movimiento, metabolismo, apoptosis, división y morfología celular entre otras (Wu y cols. 2002, Farooq y Zhou 2004).

La MAPK es una serina-treonina cinasa de la cual se conocen dos isoformas denominadas ERK1 (360 aminoácidos; del inglés extracellular regulated kinase) y ERK 2 (343 aminoácidos), quienes por tener un 84% de similitud en su secuencia de aminoácidos y compartir sus funciones principales se conocen como ERK1/2 ó MAPK (Lloyd 2006). Estructuralmente, la MAPK posee un lóbulo N-terminal y un lóbulo C-terminal. Esta cinasa transfiere grupos fosfato del ATP a los residuos de serina y treonina en proteínas específicas, como factores de transcripción (RP, RE; Lange 2004), proteínas del citoesqueleto, cinasas y otras enzimas.

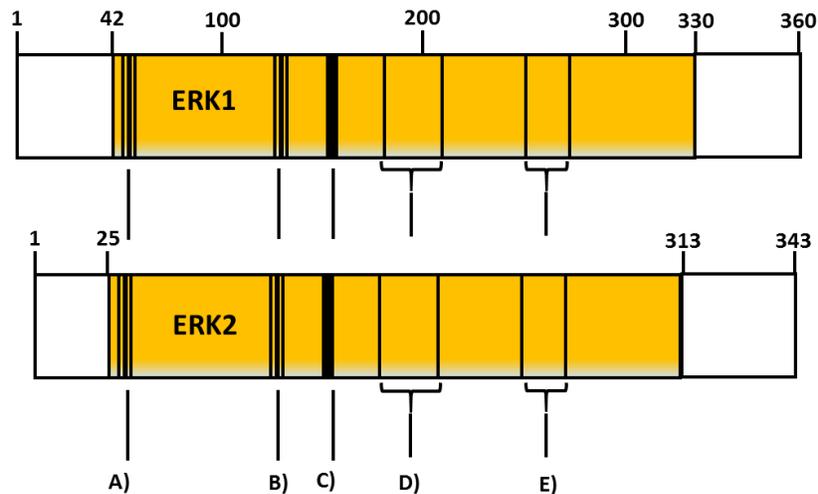


Figura 12. Estructura modular de la ERK1/ERK2. La figura muestra el alto grado de homología entre las dos proteínas, razón por la cual se hace referencia a ambas como MAPK. **A)** Segmento rico en glicina; **B)** Región de la bisagra; **C)** Motivo catalítico; **D)** Segmento de activación; **E)** Dominio de inserción de la cinasa. Modificado de Roskoski y cols. 2012.

1.7.9. PKA, PKG, Src y MAPK en la expresión de la conducta de lordosis

Actualmente, está bien establecido que diferentes proteínas cinasas participan en regular, ya sea activando o disminuyendo la expresión de la CL. La mayoría de este conocimiento ha sido adquirido a través de la utilización de inhibidores específicos para cada una de las cinasas, ya que se ha encontrado la reducción del despliegue de esta conducta, mientras que la inyección de diversos análogos la induce (Mobbs y cols. 1989, Etgen y cols. 2006, González-Flores y cols. 2006, Mani y Portillo 2010, Lima-Hernández y cols. 2012).

Por ejemplo, el papel de la PKA ha sido explorado a través de la uso del RpcAMPS, un inhibidor específico de la PKA, el cual al ser administrado directamente en el cerebro disminuye la CL inducida por progesterona y sus metabolitos reducidos en el anillo A (Mani y cols. 2000, González-Flores y cols. 2006), o la inducida por la GnRH, la prostaglandina E2, dibutiril AMPc y leptina en ratas pretratadas con BE (Kow y Pfaff 2004, Ramírez-Orduña y cols. 2007, García-Juárez y cols. 2013), lo cual sugiere la participación del sistema de AMPc-PKA en la regulación de la CL.

Por otro lado, la participación de PKG y sus efectos sobre la CL ha sido explorada mediante la inyección del inhibidor de esa enzima, el KT5823, el cual disminuyó la CL inducida por diferentes fármacos lordogénicos en ratas OVX pretratadas con BE (leptina; Chu y Etgen 1997, Chu y cols. 1999, García-Juárez y cols. 2012). O bien indirectamente (ya que se requiere de un incremento en el GMPc para la activación de la PKG) a través la administración de análogos del GMPc (Fernández-Guasti y cols. 1983), como el 8-bromoguanosina 3',5'- monofosfato cíclico (8-bromo-GMP), los cuales indujeron CL en ratas OVX pretratadas con BE.

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha explorado la participación de la proteína cinasa Src, mediante la inyección del PP2, un inhibidor de esa cinasa, el cual disminuyó la expresión de la CL en la rata inducida tanto por diversas progestinas como por otros compuestos no esteroideos (González-Flores y cols. 2010, Lima-Hernández y cols. 2012).

Finalmente, la inyección del PD98059, inhibidor de la MAPK, disminuyó la CL inducida por la inyección de progestinas, péptidos, prostaglandinas así como por estimulación vaginocervical, (Etgen y Acosta-Martínez 2003, Acosta-Martínez y cols. 2006, García-Juárez y cols. 2013, González-Flores y cols. 2009).

1.8. Mecanismos celulares involucrados en la inducción de la conducta de lordosis

En esta sección se describen los diferentes mecanismos que han sido propuestos para explicar la manera por la cual diversos compuestos estimulan al sistema nervioso central para inducir la CL en roedores.

1.8.1. Mecanismo genómico

Este mecanismo fue inicialmente descrito por Jensen (1968) y conocido como mecanismo de acción de esteroides de doble paso el cual consiste en los siguientes eventos: (1) una vez que el esteroide llega a la célula blanco, atraviesa a la membrana celular por difusión pasiva, y se une a su receptor citoplásmico, (2) 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 al unirse a sitios aceptores en el ADN, activando la maquinaria transcripcional y la subsecuente síntesis de proteínas (Figura 13; Jensen y cols. 1968).

La participación de este mecanismo en la inducción de la CL es apoyada por diversos hallazgos:

1. Se ha observado que el 17- β estradiol provoca la síntesis de proteínas, entre ellas el RP (O'Malley y cols. 1991).
2. Existe una latencia considerable (4 a 6 h), entre la administración sistémica de progesterona y la inducción de la CL (Whalen y Gorzalka 1972, Glaser y cols. 1983, Pleim y DeBold 1984).
3. La acción lordogénica de la progesterona es disminuida por la administración de inhibidores de la 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 CL (Blaustein y Wade 1977, McGinnis y cols. 1981, Ahdieh y cols. 1986).
5. La acción lordogénica de la progesterona es disminuida por la antiprogestina RU486, que compite con la progesterona por su unión con el RP (Brown y Blaustein 1984, Etgen y Barfield 1986, González-Mariscal y cols. 1989).
6. La inhibición secuencial (el efecto de la progesterona como inductor de la CL, es seguido por un periodo en el cual las hembras son refractarias a la reactivación de la lordosis por una segunda administración de progesterona), coincide con una “regulación a la baja” del RP en el HVM y el APOm (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 progesterona (Moguilewsky y Raynaud 1979), tienen una potencia lordogénica mayor que la progesterona.
8. La administración de oligonucleótidos antisentido para el RP tanto en ratas como ratones, así como en ratones Knock out, evita el despliegue de la CL aún después de ser tratados con BE y progesterona (Guerra-Araiza y cols. 2009, Mani y Portillo 2010).

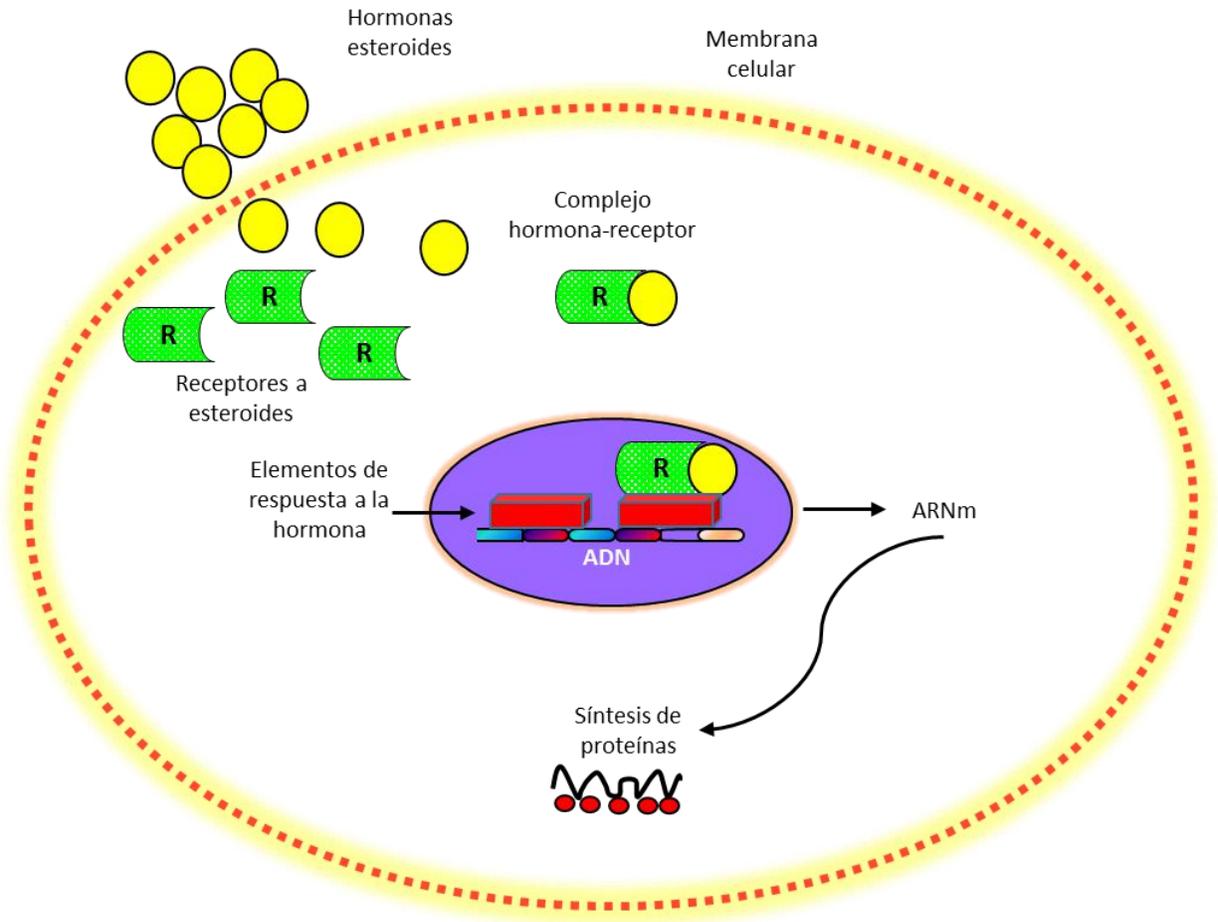


Figura 13. Mecanismo genómico. El mecanismo sugiere que las hormonas esteroides atraviesan por difusión pasiva la membrana celular y que una vez en el citoplasma se unen a sus receptores, formando el complejo hormona-receptor, que al ser translocado al núcleo funciona como factor de transcripción. ADN, ácido desoxirribonucleico; ARNm, ácido ribonucleico mensajero. Modificado de Jensen y cols. 1968.

1.8.2. Mecanismo extragenómico

Éste es un modelo alternativo al mecanismo genómico para la acción de las hormonas esteroides propuesto por Kuo y Greengard (1969). Este modelo plantea a la fosforilación de proteínas como el principal evento bioquímico, ya que la acción celular de los esteroides puede ser influenciada por neurotransmisores al activar a sus receptores membranales, evento que induce la formación de segundos mensajeros (Figura 14). Posteriormente, este mecanismo fue descrito para aquellos compuestos no esteroideos que ejercen su acción sobre la membrana celular (Beyer 1980, Beyer y Canchola 1981, Etgen, 1984, Beyer y González-Mariscal 1986).

Beyer y cols. (1982), propusieron en un inicio que el segundo mensajero podría ser el AMPc, que a su vez activaría a su proteína cinasa correspondiente (PKA). Una vez activada esa cinasa se transloca al núcleo y fosforila los factores de transcripción nucleares que finalmente activan la transcripción de ARNm y la síntesis de proteínas.

Las evidencias que apoyan la participación de este mecanismo para la activación de la CL son:

1. Se requiere de latencias de tiempo cortas (5 a 10 min) para la inducción de la CL (Ross y cols. 1971, Kubli-Gárfias y Whalen 1977), después de la inyección intravenosa de progesterona (200 a 400 μ g), o de algunos de sus metabolitos, como la 20 α -OHP, o la 5 α -pregnan-20 α -ol-3-ona (Czaja y cols. 1974, Kubli-Gárfias y Whalen 1977).
2. Agentes no esteroideos (GnRH, péptidos, proteínas, aminas biogénicas, acetilcolina, prostaglandinas, aminoácidos y segundos mensajeros), son capaces de inducir intensa CL. Esta idea es apoyada por el hecho de que la prostaglandina E2 y la GnRH al ser administradas en el tercer ventrículo inducen la CL a las 2 h después de su administración y por la capacidad del RU486 para interferir con el efecto inductor de estos compuestos (Beyer y cols. 2003, Mani y Portillo 2010).
3. Ocurre un incremento en la concentración de AMPc en el hipotálamo mediobasal y la hipófisis anterior durante la tarde del proestro, antes de que se active la CL (Kimura y cols. 1980). Además, en estudios iniciales realizados en nuestro laboratorio, se encontró que el dibutiril AMPc, tanto infundido en el APOm (50 μ g) como inyectado sistémicamente, inducía la CL, al menos en el 50% de las hembras (Beyer y cols. 1981, Beyer y González-Mariscal 1986, Fernández-Guasti y cols. 1983).
4. La administración de progesterona conjugada con suero de albumina (impide que la progesterona penetre en la célula) directamente en el APOm, en ratas y hámster OVX pretratadas con BE, induce la CL a los 5 minutos después de su inyección (Frye y cols. 1996).

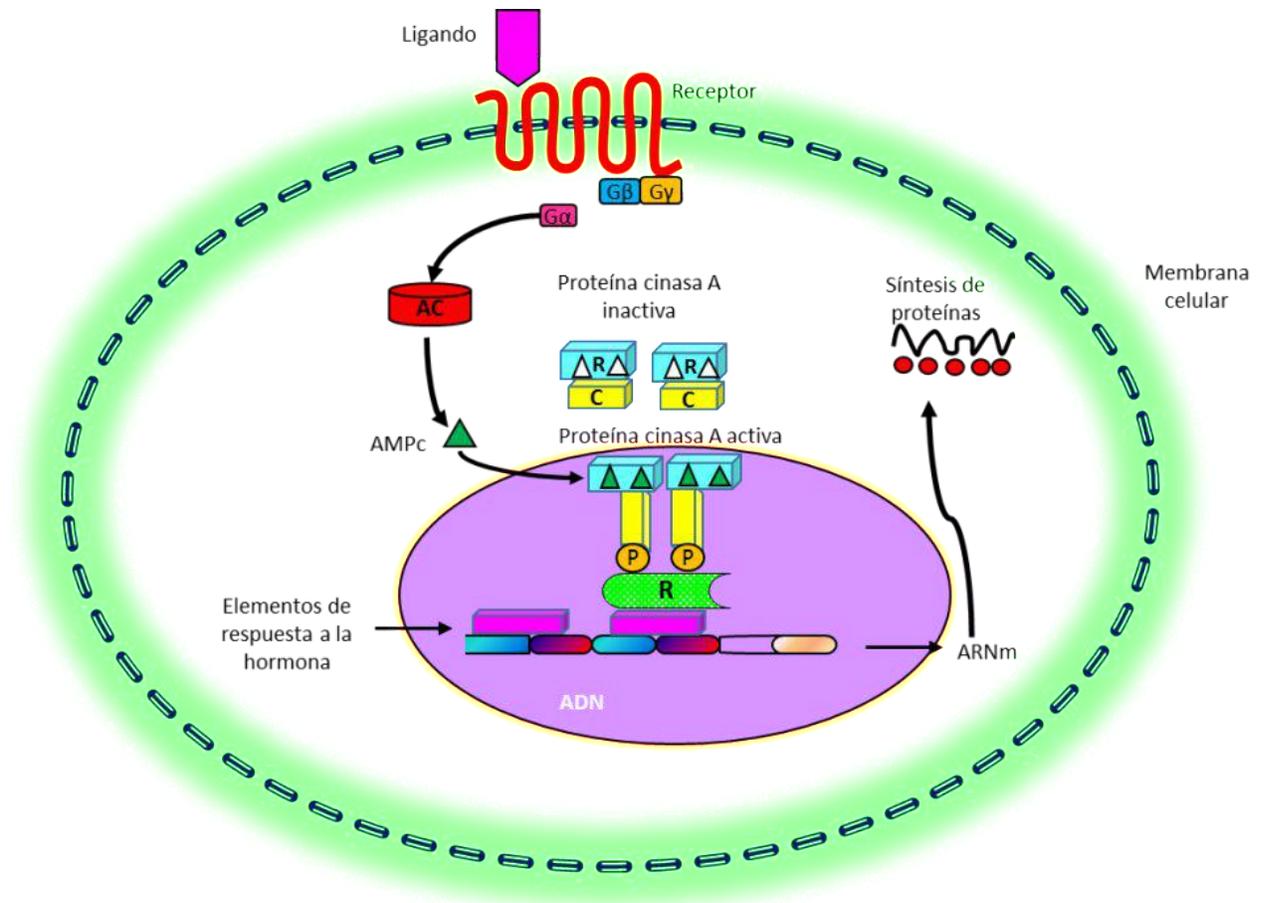


Figura 14. Mecanismo membranar, propuesto para la regulación de los receptores a esteroides por neurotransmisores. El mecanismo propone que la señalización iniciada a nivel de la membrana es la responsable de activar los receptores intracelulares de esteroides. ATP, adenosina trifosfato; ADP, adenosina difosfato; AMPc, adenosina monofosfato cíclico.

1.8.3. Modelo de la comunicación cruzada entre los mecanismos genómico y extragenómico para la estimulación de la conducta de lordosis

La comunicación cruzada es un modelo donde se propone que la acción inductora de la progesterona, así como de otros compuestos lordogénicos, por ejemplo la GnRH, sobre la CL en roedores es mediada por la fosforilación de proteínas (Figura 15; Beyer y Canchola 1981, Beyer y cols. 1982, Beyer y González-Mariscal 1986).

Este modelo consiste en los siguientes eventos: inicialmente, los estrógenos al llegar a sus células blanco, ubicadas en el hipotálamo, atraviesan, por difusión pasiva, la membrana celular y se difunden en el citoplasma, posteriormente se unen a sus receptores intracelulares, formando un

complejo hormona-receptor activo. Este complejo es translocado al núcleo en donde al unirse a sitios aceptores del ADN actúa como un factor de transcripción, cuyo resultado es la formación de ARNm y la síntesis de proteínas, entre ellas los receptores a progesterona (Brown y cols. 1987) en estado inactivo. La activación de estos receptores se lleva a cabo al ser fosforilados por proteínas cinasas inducidas por agentes como la misma progesterona o bien por la prostaglandina E2, la NA o la GnRH (Guevara-Guzmán y cols. 2001, Ramírez-Orduña y cols. 2007), al actuar sobre sus receptores membranales y activar cascadas de segundos mensajeros intracelulares. El efecto final de esta fosforilación da como resultado la inducción de la CL. Esto explicaría la capacidad de numerosos agentes lrodogénicos como la GnRH, prostaglandina E2 o la noradrenalina (NA), para estimular la CL sin unirse directamente al RP.

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 lrodogénico de la progesterona, en hembras de roedores OVX y estrogenizadas.

Las evidencias en favor de la comunicación cruzada entre el mecanismo membranal y el genómico para la activación de la CL son:

1. El efecto inductor de la progesterona u otros compuestos no esteroideos sobre la CL en la rata, requiere de un pretratamiento con BE por un tiempo mínimo de 24 a 36 horas (Powers 1970).
2. La activación de diversos receptores a esteroides puede ocurrir en ausencia de su ligando, ya sea por factores de crecimiento, neurotransmisores o agentes que activan a la PKA (Cenni y Picard 1999).
3. El efecto inductor de la leptina, dopamina, GnRH, progestinas reducidas en el anillo A, prostaglandina E2 y dbAMPC sobre la CL de la rata, fue disminuido por la administración de la antiprogestina RU486 (González-Mariscal y cols. 1989, Mani y cols. 1996, Beyer y cols. 1995, Beyer y cols. 1997, García-Juárez y cols. 2011). Dichos compuestos producen su efecto al activar vías de señalización intracelular y en consecuencia la activación de proteínas cinasas, sin la interacción directa con el RP (Mani y cols. 2000, González-Flores y Etgen 2004, Ramírez-Orduña y cols. 2007, Lima-Hernández y cols. 2012).
4. El GMPc, induce la CL en ratas OVX previamente estrogenizadas (Fernández-Guasti y cols. 1983, Chu y Etgen 1997), a través de la activación de la MAPK, ya que el PD98059 disminuyó la CL inducida por el 8-bromo-GMPc (González-Flores y Etgen 2004).

5. El AMPc media los efectos de la GnRH para la activación de la CL, ya que la administración de inhibidores de fosfodiesterasas (teofilina y metil isobutil xantina), prolonga la acción del AMPc al inhibir su degradación (Beyer y cols. 1982) y por lo tanto la prolongación de la CL.

Actualmente se ha comprobado la existencia de la comunicación cruzada para la activación de la CL (Cenni y Picard 1999, Qiu y Lange 2003), en donde el mediador molecular común es el RP, ya que integra la multitud de señales que provienen de la matriz extracelular (González-Mariscal y cols. 1989, Beyer y cols. 1995, Beyer y cols. 1997), al ser fosforilado por diversas cinasas para su activación (Beyer y González-Mariscal 1986, González-Flores y Etgen 2004, Lange 2004, García-Juárez y cols. 2013, Lima-Hernández y cols. 2012).

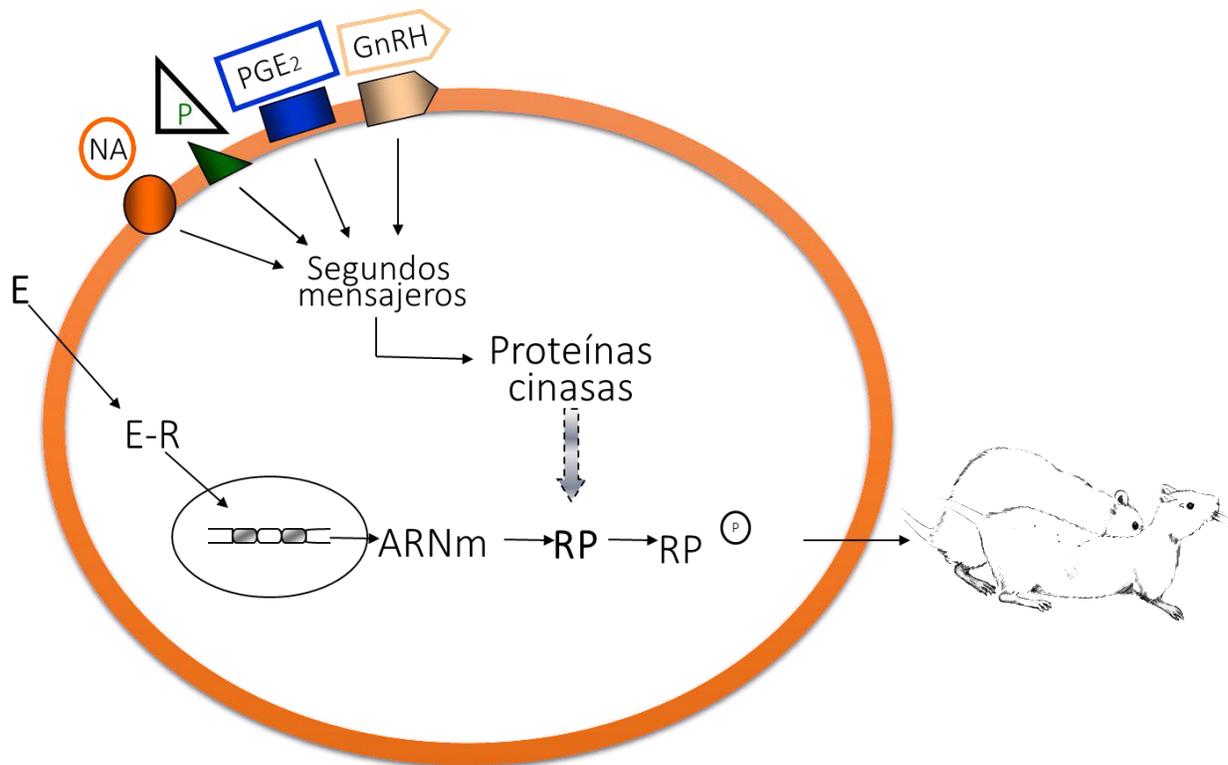


Figura 15. Modelo de comunicación cruzada entre los mecanismos membranal y genómico propuesto por Beyer y cols. 1980. El modelo propone la activación de la conducta estral por compuestos que ejercen su efecto sobre la membrana de las células nerviosas involucradas en la activación de la conducta de lordosis. E, estrógeno; E-R, receptor de estrógeno; NA, noradrenalina; P, pregnanos; PGE2, prostaglandina E2; GnRH, hormona liberadora de la hormona luteinizante; ARNm, ácido ribonucleico mensajero; RP, receptor a progesterona, RP^P, receptor a progesterona fosforilado. Modificado de Beyer y cols. 1980.

2. ANTECEDENTES

Como ya fue mencionado en párrafos anteriores, se requiere que haya transcurrido un mínimo periodo de tiempo, entre 18 a 20 horas, para que la acción sinérgica entre el BE y la progesterona provoque que la hembra muestre CL y proceptividad (Green y cols. 1970, Sinchak y Micevych 2001). Se ha demostrado que la CL pero no la proceptividad también puede ser inducida con solo 17- β estradiol, sin necesidad de la administración de progesterona, en el modelo de la rata OVX y pretratada con BE. Así, la inyección de dosis altas de BE (1 mg) induce clara CL (Blaustein y cols. 1987). Además, la administración repetida de dosis bajas de BE (0.8 ó 3.2 $\mu\text{g}/\text{día}$) por 4 días, también induce CL (Davidson y cols. 1968, Edwards y cols. 1968). El mecanismo celular por el cual el 17- β estradiol activa la CL ha sido menos estudiado que el efecto sinérgico entre este esteroide y la progesterona. Sin embargo, se ha encontrado que para inducir receptividad con una dosis única de BE, se requieren de dosis altas (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) de éste en comparación con aquellas hembras que reciben el pretratamiento con BE y posteriormente son inyectadas con progesterona (Zemlan y Adler 1977, Blaustein y Mani 2007).

Resultados recientes han mostrado que, además del mecanismo de acción clásico que ejerce el 17- β estradiol en el núcleo, también actúa sobre receptores localizados en la membrana celular, los cuales activan diferentes vías de señalización intracelular, como la MAPK, la proteína cinasa Src (Migliaccio y cols. 1996), la PKA (Shingo y Kito 2005) o bien la producción de óxido nítrico (Ceccatelli y cols. 1996), que a su vez activa a la PKG (Micevych y Dewing 2011). Estas vías de señalización han sido involucradas en la regulación de la CL inducida por una variedad de compuestos con diferentes estructuras químicas en roedores previamente estrogenizados (Chu y cols. 1999, González-Flores y Etgen 2004, Kow y Pfaff, 2004, González-Flores y cols. 2006). Se conoce que la unión del 17- β estradiol con sus receptores localizados en los núcleos de diferentes áreas cerebrales, es un prerequisite para que se produzca la activación de la maquinaria intracelular involucrada en la inducción de la CL. Así, en diferentes trabajos, en donde se han utilizado agentes que interfieren con este proceso reducen el despliegue de dicha conducta (Blaustein y Wade 1977, Landau 1977, Micevych y Dewing 2011). El efecto preparador que ejerce el 17- β estradiol sobre las estructuras nerviosas relacionadas con la expresión de la CL está claramente establecido, sin embargo, actualmente no se conoce si pequeñas cantidades de 17- β estradiol (nanogramos; ng) administradas por vía icv inducen la CL.

En la mayoría de los estudios en donde se han explorado los efectos del 17- β estradiol, frecuentemente se utilizan diferentes anti-estrógenos (tamoxifén, ICI 182780) como herramientas farmacológicas, ya que al competir con el 17- β estradiol por sus receptores pueden bloquear el pretratamiento para que posteriormente los compuestos lódogénicos (P, GnRH, etc.) no puedan inducir la CL. Sin embargo, los esquemas de tratamiento varían en los diversos estudios ya que algunos anti-estrógenos se han administrado antes o después del pre-tratamiento (Blaustein y Wade 1977, McKenna y cols. 1992). Así, con estos esquemas y con el uso del 17- β estradiol, ya sea, esterificado con benzoato o no esterificado, como el 17- β estradiol, se demostró que el BE es más efectivo que el 17- β estradiol en preparar las áreas cerebrales relacionadas con la expresión de la CL (Feder y Silver 1974, Blaustein y Mani 2007).

En estudios relacionados con la biodisponibilidad tanto del 17- β estradiol como del BE en el cerebro, se ha demostrado que 1 o 2 horas después de la inyección de 17- β estradiol se produce un incremento agudo de esta hormona en los tejidos neurales blanco (hipotálamo y área preóptica), el cual es seguido por una disminución rápida, cercana a los niveles basales a las 12-16 horas después de su administración (Roy y Wade 1977, Blaustein y Mani 2007), mientras que, la inyección de BE presenta un incremento lento (>24 horas) en las áreas cerebrales pero con un efecto prolongado (48 horas; (Landau, 1977, Blaustein y cols. 1979, Blaustein y Mani 2007). Por otro lado, en términos conductuales, se ha demostrado que el 17- β estradiol es menos efectivo para inducir receptividad que el BE, ya que, los umbrales de las dosis utilizadas del 17- β estradiol fueron aproximadamente siete veces mayores que el BE para que posteriormente la progesterona indujera la lordosis, pero solo después de 24 horas transcurridas después de la administración del BE (McEwen y cols. 1975, Roy y Wade 1977).

Con estos datos se puede especular sobre la posibilidad de que el 17- β estradiol actúe sobre el SNC utilizando diferentes mecanismos de acción. Por un lado, a través del mecanismo intracelular clásico en donde la hormona prepara las estructuras nerviosas, ejerciendo efectos genómicos para que posteriormente la progesterona u otros compuestos induzcan CL. Pero también que el 17- β estradiol podría ejercer efectos similares a los de la progesterona, es decir disparando la expresión de la CL y probablemente lo realice al activar a los receptores a estrógenos localizados en el citoplasma o en la membrana celular.

Esta propuesta coincide con los resultados recientemente publicados en nuestro laboratorio, en donde encontramos que la CL inducida por compuestos como el GnRH y la

prostaglandina E2, que debido a su lipofobicidad no penetran a la célula y ejercen su efecto sobre la membrana, fue disminuida por el MSRE, tamoxifén e ICI 182780 (Lima-Hernández y cols. 2014).

3. JUSTIFICACIÓN

Se conoce que la CL en la rata es producida por la acción sinérgica entre el 17- β estradiol y la progesterona, sin embargo, la administración de dosis altas o repetidas de 17- β estradiol (por varios días), también induce la expresión de dicha conducta. Se ha propuesto que el 17- β estradiol ejerce sus efectos a través de unirse a sus receptores localizados tanto en la membrana como dentro de la célula. Esto plantea la posibilidad de que el 17- β estradiol podría ejercer sus efectos a través de diferentes mecanismos celulares ya sea activando a su propio receptor intracelular o quizá indirectamente al de progesterona. Además, se ha demostrado que la activación de sus receptores membranales incrementa los niveles de la sintasa del óxido nítrico, o bien activa diversas proteínas cinasas como a la Src, PKA y la MAPK. Actualmente se conoce que esas vías de señalización intracelular participan sobre la CL inducida por una variedad de compuestos, pero no sobre la CL inducida por 17- β estradiol en ratas ovariectomizadas-pretratadas con BE.

4. HIPÓTESIS

El 17- β estradiol induce conducta de lordosis a través de la activación de los receptores a estrógenos y el receptor a progesterona, así como de una serie de señales intracelulares que involucran la participación del sistema de proteínas cinasas A, G, Src y MAPK en ratas ovariectomizadas-pretratadas con benzoato de 17- β estradiol.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Explorar los mecanismos celulares involucrados en la expresión de la conducta de lordosis inducida por 17- β estradiol.

5.2. Objetivos específicos

1. Realizar curvas dosis respuesta del 17- β estradiol administrado por vía intracerebroventricular para establecer la dosis efectiva para inducir la conducta de lordosis en ratas ovariectomizadas-pretratadas con benzoato de 17- β estradiol.
2. Evaluar la participación de los receptores a estrógenos sobre la conducta de lordosis inducida por la administración intracerebroventricular de 17- β estradiol en ratas ovariectomizadas-pretratadas con benzoato de 17- β estradiol, a través de la administración intracerebroventricular del modulador selectivo de los receptores a estrógenos, tamoxifén.
3. Explorar la participación del receptor a progesterona sobre la conducta de lordosis inducida por la administración intracerebroventricular de 17- β estradiol en ratas ovariectomizadas-pretratadas con benzoato de 17- β estradiol, mediante la administración intracerebroventricular de la antiprogestina RU486.
4. Explorar la participación de diferentes vías de señalización intracelular sobre la expresión de la conducta de lordosis inducida por la administración intracerebroventricular de 17- β estradiol en ratas ovariectomizadas-pretratadas con benzoato de 17- β estradiol, a través del uso de inhibidores de las proteínas cinasas A, G, MAPK y Src.

6. METODOLOGÍA

6.1. Características de los animales

Se utilizaron 145 ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley, con un peso de entre 200 y 250 g al inicio de los experimentos, criadas en la colonia del Centro de Investigación en Reproducción Animal, Universidad Autónoma de Tlaxcala-CINVESTAV-laboratorio Panotla, Tlaxcala. Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$), con un ciclo de luz-oscuridad invertido (14 horas de iluminación por 10 horas de oscuridad, la luz se apaga a las 10:00 horas) y fueron alimentadas con nutricubos Purina (Purina, México) y agua a libre acceso.

Todos los procedimientos usados en los cuidados postoperatorios de los animales siguieron los estatutos que establecen la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y la West Virginia University ACUC POLICY Anesthesia, Surgery and Post-Operative Care of Rats and Mice.

6.2. Procedimientos quirúrgicos

Ovariectomía

Las ratas (N=145) fueron anestesiadas con una mezcla de xilazina (4 mg/kg) y ketamina (80 mg/kg) administrada por vía intraperitoneal y posteriormente rasuradas en el abdomen, desde el xifoideas hasta el pubis. A continuación, se desinfectó dicha región con cloruro de benzalconio al 5% 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; inmediatamente se ligó el cuerno uterino 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 se recolocaron en el abdomen. Finalmente, la capa muscular fue suturada con un punto en “U” mediante el uso de sutura de algodón del No. 2, mientras que la piel también se suturó con un punto en “U”, pero con hilo de seda del No. 2. Con la finalidad de disminuir el dolor y prevenir infecciones los animales recibieron los fármacos mencionados en la sección *cuidados postoperatorios*.

Implantes intracerebroventriculares

Las ratas OVX fueron anestesiadas con una mezcla de xilazina (4 mg/kg) y ketamina (80 mg/kg) inyectada por vía intraperitoneal 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. Con la finalidad de disminuir el dolor y prevenir infecciones los animales recibieron los fármacos mencionados en la sección *cuidados postoperatorios*.

Todos los procedimientos usados en estos experimentos siguieron los estatutos que conforman la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y la West Virginia University ACUC POLICY Anesthesia, Surgery and Post-Operative Care of Rats and Mice.

Cuidados postoperatorios

A. Periodo de recuperación anestésica

Inmediatamente después de las cirugías, los animales recibieron solución salina por vía intraperitoneal (10 ml/kg; West Virginia University ACUC POLICY Anesthesia, Surgery and Post-Operative Care of Rats and Mice), con la finalidad de rehidratarlos, y se colocaron en jaulas individuales, forradas con toallas de papel, para evitar la ingestión de cuerpos extraños y la posterior obstrucción traqueal durante el periodo de recuperación anestésica.

Durante la recuperación los animales recibieron calor externo por medio de una lámpara colocada a 45 centímetros de distancia del animal y se mantuvo así hasta que el animal se reincorporó sobre sus cuatro patas. Con la finalidad de disminuir el dolor durante el periodo postoperatorio, cada animal fue inyectado con Carprofeno 5 mg/kg c/24 horas x 3 días por vía subcutánea. Los fármacos administrados para prevenir infecciones bacterianas fueron bencilpenicilina procaínica a una dosis de 22000 UI y bencilpenicilina cristalina a una dosis de 7500 UI c/24 horas x 3 día, vía intramuscular, la aguja fue del calibre 25*16 mm y el volumen

fue de 0.1 ml. Posteriormente al implante de la cánula en el ventrículo lateral derecho, los animales permanecieron en jaulas individuales hasta el final del experimento.

B. Observaciones en el periodo postoperatorio

Después de las cirugías los animales fueron examinados al menos una vez por día por 5 días. La revisión diaria incluyó la observación de la incisión con la finalidad de encontrar inflamación de la herida postoperatoria.

Todos los procedimientos usados en los cuidados postoperatorios de los animales siguieron los estatutos que establece la West Virginia University ACUC POLICY Anesthesia, Surgery and Post-Operative Care of Rats and Mice.

Fármacos

El 17- β estradiol, el BE, la antiprogesterina RU486 y el tamoxifén fueron obtenidos de Sigma (St. Louis MO, EUA). El KT5823 (inhibidor de la proteína cinasa G), el PD98059 (inhibidor de la proteína cinasa MAPK) y el PP2 (inhibidor de la cinasa Src), se obtuvieron de Calbiochem (La Jolla, CA, EUA). Mientras que el RpcAMPS (inhibidor de la proteína cinasa A) se obtuvo de RBI (Natick, MA, EUA).

El 17- β estradiol fue disuelto en aceite de cártamo a diferentes concentraciones 0.016, 0.08, 0.4, 2 y 10 ng / μ l. De forma similar, el BE fue disuelto en aceite de cártamo pero a una concentración de 50 μ g/ml. En dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%, se disolvieron el KT5823 (0.12 μ g/ μ l), el PP2 (30 μ g/ μ l) y el PD98059 (3 μ g/ μ l). Mientras que el RpcAMPS (200 ng/ μ l) fue disuelto en solución salina estéril. Con excepción del BE, que se administró en 0.1 ml por vía subcutánea, todos los compuestos fueron administrados, en un volumen de 1 μ l, con una jeringa Hamilton de 10 μ l, a través de una cánula implantada en el ventrículo cerebral derecho.

Las dosis de 17- β estradiol se basaron en los experimentos dosis-respuesta realizados en nuestro laboratorio. En cambio las dosis de RU486 y tamoxifén se basaron en trabajos previos relacionados con la CL (García-Juárez y cols. 2011, Lima-Hernández y cols. 2014). La dosis KT5823, se basó en trabajos de (Chu y Etgen 1997, Chu y cols. 1999, González-Flores y cols. 2009, García-Juárez y cols. 2012). Las dosis de PD98059, RpcAMPS y PP2 se basaron en los trabajos nuestro grupo de investigación (González-Flores y cols. 2006, González-Flores y cols. 2009, Lima-Hernández y cols. 2012, García-Juárez y cols. 2013).

6.3. Evaluación de la conducta de lordosis

Las hembras fueron sometidas a pruebas de CL dentro de arenas circulares de plexiglás de 60 centímetros de diámetro con machos sexualmente expertos, realizando las pruebas a los 30, 120 y 240 minutos después de la administración del 17- β estradiol. Las pruebas duraron hasta que las hembras recibieron diez montas vigorosas por parte del macho y la receptividad sexual fue evaluada a través de dos parámetros, uno de ellos, el cociente de lordosis [$LQ = (\text{No. de lordosis} / 10 \text{ montas}) (100)$] (Beach, 1976) y el otro, la intensidad de la lordosis [$IL = (\text{Promedio de la intensidad de la lordosis obtenida en 10 montas}) (10)$] (Hardy y De Bold 1972). Para la medición de este parámetro, el observador considera el siguiente criterio propuesto por Hardy y Debold 1971, el cual es:

Grado 1. Lordosis marginal. En este grado se puede observar a la rata realizar una leve flexión de la columna vertebral, acompañada de una ligera elevación de la cabeza y la grupa seguida por la elevación de la base de la cola respecto al suelo.

Grado 2. Lordosis normal. En este caso la hembra muestra la dorsiflexión de la columna vertebral, seguida por la elevación de la cabeza aproximadamente a un ángulo de 30° respecto al suelo, acompañada de una ligera extensión de las patas delanteras, la elevación de la grupa y un movimiento lateral de la cola.

Grado 3. Lordosis exagerada. Se refiere a la pronunciada dorsiflexión de la columna vertebral, seguida por la elevación de la cabeza a aproximadamente 45° o más respecto al piso.

Comprobación del área de implante

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

6.4. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante el programa Sigma Plot versión 11.0. Inicialmente se aplicó una prueba de análisis de varianza para datos no paramétricos (Kruskal-Wallis). Posteriormente se realizó una prueba post hoc (U de Mann-Whitney) para comparar las diferencias entre los grupos

tratados contra el grupo control (Siegel y Castellan 1995). Los resultados con una $p < 0.05$ se consideraron como significativos y aquellos con una $p < 0.01$ como altamente significativos. Los resultados fueron expresados como la media más el error estándar.

6.5. Procedimiento experimental

6.5.1. Experimento 1. *Efecto de la administración de diferentes dosis de 17- β estradiol por vía intracerebroventricular sobre la conducta de lordosis en ratas ovariectomizadas-pretratadas con benzoato de 17- β estradiol.*

Una semana después del implante de la cánula, cada animal (n=55) recibió una inyección subcutánea de BE (5 μ g). Una vez transcurridas 40 horas, se dividió a las hembras en 6 grupos que recibieron icv, 0.016 (n = 8), 0.08 (n = 9), 0.4 (n = 8), 2 (n = 10) ó 10 ng (n = 8) de 17- β estradiol o su vehículo (aceite de cártamo; n= 12). Posteriormente, las pruebas de CL se realizaron de acuerdo con los tiempos establecidos previamente.

6.5.2. Experimento 2. *Efecto del tamoxifén, modulador selectivo de los receptores a estrógenos, sobre la expresión de la conducta de lordosis inducida por la inyección icv de 17- β estradiol, en ratas ovariectomizadas-pretratadas con benzoato de 17- β estradiol.*

Una semana después del implante de la cánula, cada animal (n= 8) recibió una inyección subcutánea de 5 μ g de BE, seguida a las treinta y nueve horas y media (39.5 horas) por la administración icv de 5 μ g de TMX y media hora después (40 horas) una dosis icv de 2 ng de 17- β estradiol. Posteriormente, las pruebas de CL se realizaron de acuerdo con los tiempos establecidos previamente.

6.5.3. Experimento 3. *Efecto de la administración icv de la antiprogesterina RU486, antagonista del receptor a progesterona, sobre la expresión de la conducta de lordosis inducida por la administración icv de 17- β estradiol, en ratas ovariectomizadas-pretratadas con benzoato de 17- β estradiol.*

Una semana después del implante de la cánula, cada animal (n=10), recibió una inyección subcutánea de 5 μ g de BE, seguida a las 39 horas por la administración icv de 5 μ g de la antiprogesterina RU486 y una hora después (40 horas) una dosis icv de 2 ng de 17- β estradiol.

Posteriormente, las pruebas de CL se realizaron de acuerdo con los tiempos establecidos previamente.

6.5.4. Experimento 4. *Efecto de la administración icv del RpcAMPS, KT5823, PD98059, y PP2, inhibidores de las proteínas cinasas A, G, MAPK y Src respectivamente, sobre la expresión de la conducta de lordosis inducida por la administración icv de 17- β estradiol en ratas ovariectomizadas-pretratadas con benzoato de 17- β estradiol.*

Una semana después del implante de la cánula, cada animal (n= 72) recibió una inyección subcutánea de 5 μ g de BE. Una vez transcurridas 39.5 horas, se dividió a los animales en 6 grupos que recibieron por vía icv 0.2 μ g de RpcAMPS (n= 12), 0.12 μ g de KT5823 (n= 12), 3 μ g de PD98059 (n= 12) ó 30 μ g de PP2 (n= 12), inhibidores de la PKA, PKG, MAPK, Src respectivamente o su vehículo; solución salina (n= 12) ó DMSO (n= 12), seguido a la media hora después la inyección icv de 2 ng de 17- β estradiol que, por nuestros experimentos previos, sabemos es efectiva en la inducción de la CL. Posteriormente, las pruebas de CL se realizaron de acuerdo con los tiempos establecidos previamente.

7. RESULTADOS

7.1. Experimento 1. Efecto de la administración de diferentes dosis de 17- β estradiol por vía icv sobre la conducta de lordosis en ratas ovariectomizadas-pretratadas con BE.

La Figura 16 muestra el efecto de la inyección icv de 0.016, 0.08, 0.4, 2 ó 10 ng de 17- β estradiol o su vehículo (control), sobre el LQ a los 30, 120 y 240 minutos después de su administración, en el modelo de la rata ovariectomizada-pretratada con BE.

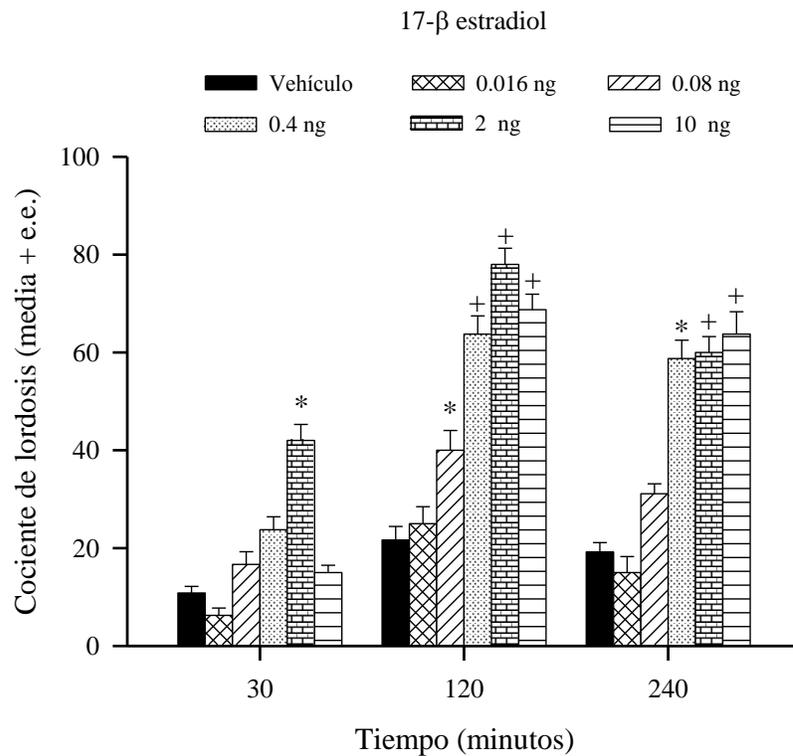


Figura 16. Efecto de la inyección icv de 0.016 ($n = 8$), 0.08 ($n = 9$), 0.4 ($n = 8$), 2 ($n = 10$) ó 10 ng ($n = 8$) de 17- β estradiol sobre el LQ en ratas ovariectomizadas-pretratadas con BE. Las hembras fueron probadas a los 30, 120 y 240 minutos después de recibir la administración icv de las diferentes dosis de 17- β estradiol o su vehículo (control $n=12$). $^+p < 0.01$, $*p < 0.05$. U de Mann-Whitney.

Las hembras del grupo control, que recibieron BE y 40 horas después el vehículo del 17- β estradiol, mostraron muy bajos niveles de LQ a los tres intervalos de tiempo estudiados. En cambio, las hembras que recibieron la combinación de BE y 17- β a una dosis de 2 ng mostraron un alto LQ a los tres tiempos probados respecto al grupo control. Por otro lado, las dosis de 0.08,

0.4, y 10 ng de 17- β estradiol, indujeron LQ estadísticamente significativo en la prueba de los 120 minutos, sin embargo a los 240 minutos solo las dosis de 0.4 y 10 ng fueron efectivas en inducir un LQ estadísticamente significativo. De gran interés para el desarrollo de este trabajo es el grupo que recibió la dosis de 2 ng, ya que mostró un incremento significativo en el LQ a los diferentes tiempos probados 30 ($p < 0.05$), 120 ($p < 0.01$) y 240 ($p < 0.01$) minutos encontrándose el nivel máximo a los 120 y 240 minutos. Al contrario de esta dosis que indujo LQ a los tres intervalos de tiempo estudiados, la dosis de 0.08 ng sólo indujo LQ significativo a los 120 ($p < 0.05$) minutos. En cambio la dosis de 0.4 ng indujo el LQ tanto a los 120 ($p < 0.01$) como a los 240 ($p < 0.01$) minutos. Además, la inyección de 10 ng también indujo el LQ a los 120 ($p < 0.01$) como a los 240 ($P < 0.01$) minutos.

La intensidad de lordosis (IL; Figura 17) muestra la misma tendencia que el LQ después de la administración de 17- β estradiol. Donde se presentó un incremento significativo con la dosis de 2 ng, a los diferentes tiempos probados, es decir, a los 30 ($p < 0.05$), 120 ($p < 0.01$) y a los 240 minutos ($p < 0.01$). En cambio, las dosis de 0.4 ng y 10 ng indujeron una IL similar tanto a los 120 ($p < 0.05$) como a los 240 minutos ($p < 0.01$).

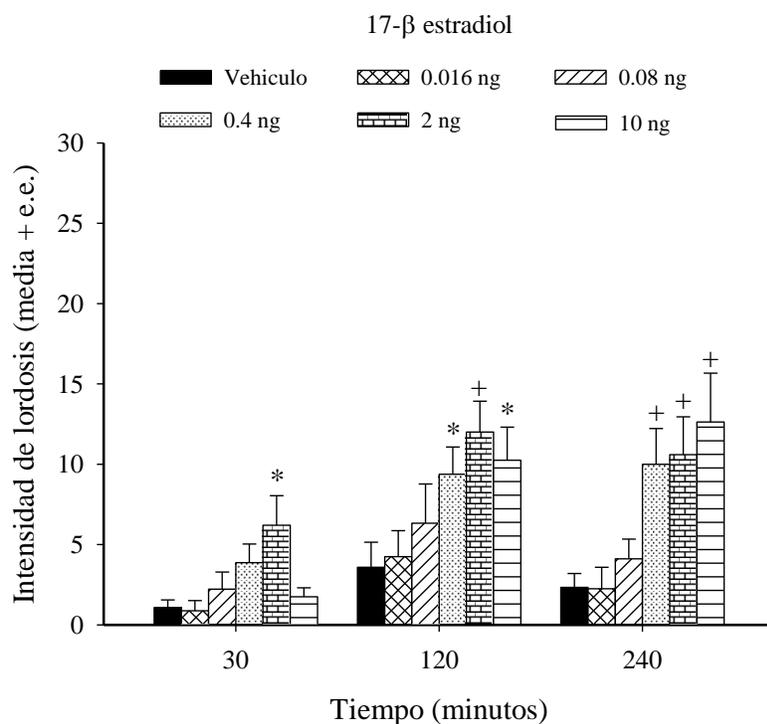


Figura 17. Efecto de la inyección icv de 0.16 ($n = 8$), 0.08 ($n = 9$), 0.4 ($n = 8$), 2 ($n = 10$) ó 10 ng ($n = 8$) de 17- β estradiol sobre la IL en ratas hembra ovariectomizadas y pretratadas con BE. Las hembras fueron probadas a los 30, 120 y 240 minutos después de recibir la administración

*icv de las diferentes dosis de 17-β estradiol o su vehículo (control n = 12). ⁺p < 0.01, *p < 0.05. U de Mann-Whitney.*

7.2. Experimento 2. *Efecto del tamoxifén, modulador selectivo de los receptores a estrógenos, sobre la expresión de la conducta de lordosis inducida por la inyección icv de 17-β estradiol, en ratas OVX-pretratadas con BE.*

La Figura 18 muestra que la administración icv de 5 μg de tamoxifén disminuyó significativamente el LQ inducido por 2 ng de 17-β estradiol (panel A) a los 30 (p < 0.05), 120 (p < 0.05) y 240 (p < 0.05) minutos en ratas OVX-pretratadas con BE. Además, el tamoxifén redujo significativamente la expresión de la IL (panel B) a los 30 minutos (p < 0.05) después de la inyección de 2 ng de 17-β estradiol.

7.3. Experimento 3. *Efecto de la administración icv de la antiprogestina RU486, antagonista del receptor a progesterona, sobre la expresión de la conducta de lordosis inducida por la administración icv de 17-β estradiol, en ratas OVX-pretratadas con BE.*

La Figura 19 (panel A) muestra el LQ inducido por la administración icv de 2 ng de 17-β estradiol. La administración de RU486 disminuyó significativamente dicho parámetro conductual inducido por este esteroide a los 120 (p < 0.01) y 240 minutos (p < 0.05). Además, el RU486 también disminuye significativamente la IL (panel B) a los 120 (p < 0.01) y 240 minutos (p < 0.05) después de la inyección del 17-β estradiol.

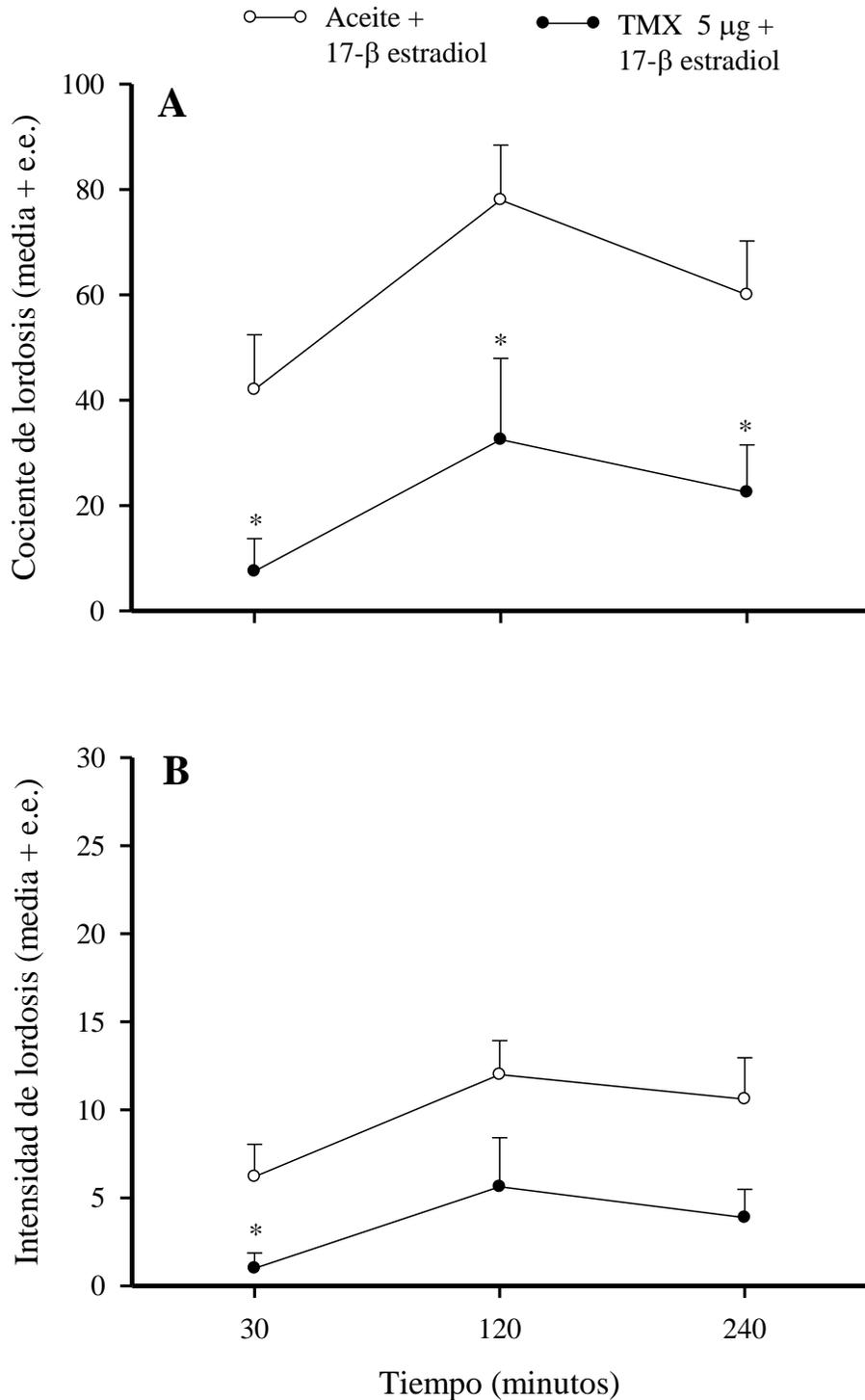


Figura 18. Efecto de la inyección icv de 5 μg de tamoxifén sobre el LQ (panel A) y la IL (panel B) inducida por 2 ng de 17-β estradiol (n = 8). El LQ inducido por 2 ng de 17-β estradiol a los 30, 120 y 240 minutos fue disminuido por la inyección previa de tamoxifén. En cambio, la IL inducida por 2 ng de 17-β estradiol solo fue disminuida a los 30 minutos por la inyección previa del tamoxifén. El tamoxifén fue inyectado 30 minutos antes de la administración de 17-β estradiol. *p < 0.05, +p < 0.01, U de Mann-Whitney.

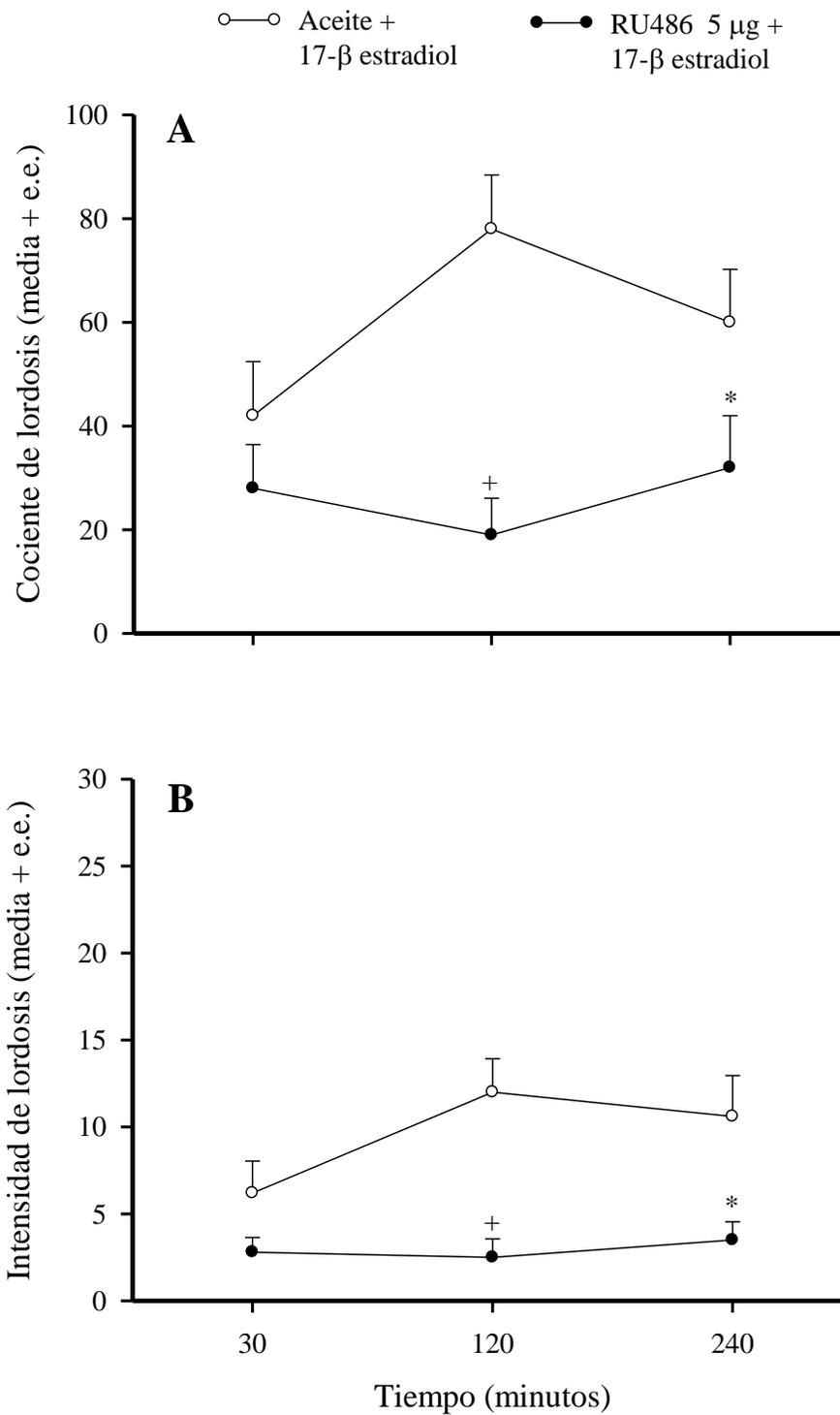


Figura 19. Efecto de la inyección icv de 5 μg de RU486 sobre el LQ inducido por 2 ng de 17-β estradiol (n = 10). El LQ (panel A) y la IL (Panel B) inducidos por 2 ng de 17-β estradiol fueron disminuidos tanto a los 30 como a los 120 minutos por el RU486. El RU486 fue inyectado 60 minutos antes de la administración del 17-β estradiol. +p <0.01, *p <0.05. U de Mann-Whitney.

7.4. Experimento 4. *Efecto de la administración icv del RpcAMPS, KT5823, PD98059 y PP2, inhibidores de las proteínas cinasas A, G, MAPK y Src respectivamente, sobre la expresión de la conducta de lordosis inducida por la administración icv de 17-β estradiol en ratas ovariectomizadas-pretratadas con BE.*

En la figura 20 se muestran los resultados obtenidos con la inyección del inhibidor de la proteína cinasa A, el RpcAMPS, sobre el LQ (Figura 20A) y la IL (Figura 20B) inducidos por 2 ng de 17-β estradiol, en la rata ovariectomizada pretratada con BE. La Figura 20A muestra que el RpcAMPS disminuyó de manera significativa el LQ a los diferentes tiempos probados, es decir, a los 30 ($p < 0.05$), 120 ($p < 0.01$) y 240 ($p < 0.05$) minutos después de la administración de 2 ng de 17-β estradiol. El efecto del RpcAMPS sobre la IL (Figura 20B) fue muy parecido al observado sobre el LQ, ya que este parámetro conductual fue disminuido a los 30 ($p < 0.05$) a los 120 ($p < 0.01$) y a los 240 ($p < 0.05$) minutos después de la administración del 17-β estradiol.

Por otro lado, en la Figura 21 se muestran los resultados obtenidos con la administración del KT5823, inhibidor de la proteína cinasa G más 2 ng de 17-β estradiol sobre el LQ (Figura 21A) y la IL (Figura 21B) en la rata ovariectomizada pretratada con BE.

En la Figura 21A se muestra que el KT5823 sólo disminuyó de manera significativa el LQ inducido por 2 ng de 17-β estradiol a los 30 ($p < 0.05$), a los 120 ($p < 0.01$) y 240 ($p < 0.001$) minutos después de la administración de 17-β estradiol. De igual manera, la IL inducida por 2 ng de 17-β estradiol fue disminuida significativamente por el KT5823, a los 30 ($p < 0.05$), a los 120 ($p < 0.01$) y a los 240 ($p < 0.01$) minutos en que se evaluó la conducta sexual de las hembras (Figura 21B).

Interesantemente, en la Figura 22 (panel A) se muestra el efecto de la administración de PD98059 sobre el LQ inducido por 17-β estradiol. La inyección de 3.3 ng de PD98059 disminuyó significativamente el LQ inducido por 2 ng de 17-β estradiol a los tres tiempos probados, es decir, a los 30 ($p < 0.05$), 120 ($p < 0.05$) y 240 minutos ($p < 0.001$). Resultados similares obtuvimos con la IL (figura 6B), ya que el PD98059 disminuyó este parámetro conductual a los tres tiempos probados, 30 ($p < 0.05$), 120 ($p < 0.05$) y 240 minutos ($p < 0.001$).

Por otro lado, en la Figura 23A se muestra, el efecto de la infusión icv de PP2, sobre el cociente (Figura 23A) y la intensidad (Figura 23B) de la lordosis, inducidas por la administración de 2 ng de 17- β estradiol. La administración de PP2 redujo de manera significativa el cociente de lordosis inducido por 2 ng de 17- β estradiol a los diferentes tiempos probados, es decir, a los 30 ($p < 0.05$), 120 ($p < 0.01$) y 240 ($p < 0.01$) minutos. Resultados similares obtuvimos con la IL (figura 23B), ya que el PP2 disminuyó este parámetro conductual a los tres tiempos probados, 30 ($p < 0.05$), 120 ($p < 0.01$) y 240 minutos ($p < 0.01$).

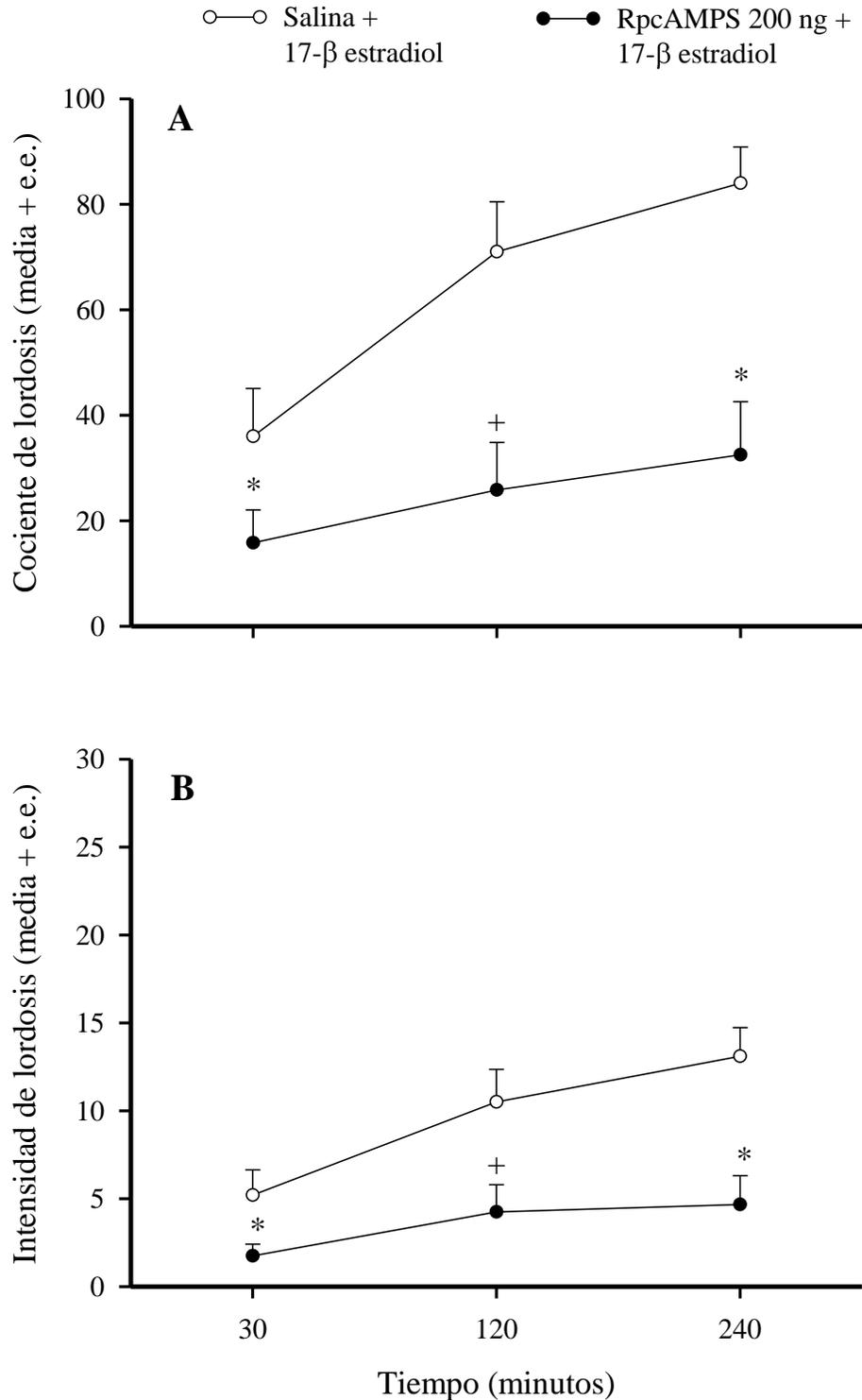


Figura 20. Efecto de la inyección del inhibidor de la cinasa A (*RpcAMPS*), sobre el cociente (A) y la intensidad (B) de la lordosis inducidos por 2 ng de 17-β estradiol. El *RpcAMPS* disminuyó de manera significativa el efecto del 17-β estradiol a los 30, 120 y 240 minutos de la evaluación conductual en ambos parámetros. El *RpcAMPS* fue inyectado 30 minutos antes de la administración del 17-β estradiol. + $p < 0.01$, * $p < 0.05$. U de Mann-Whitney.

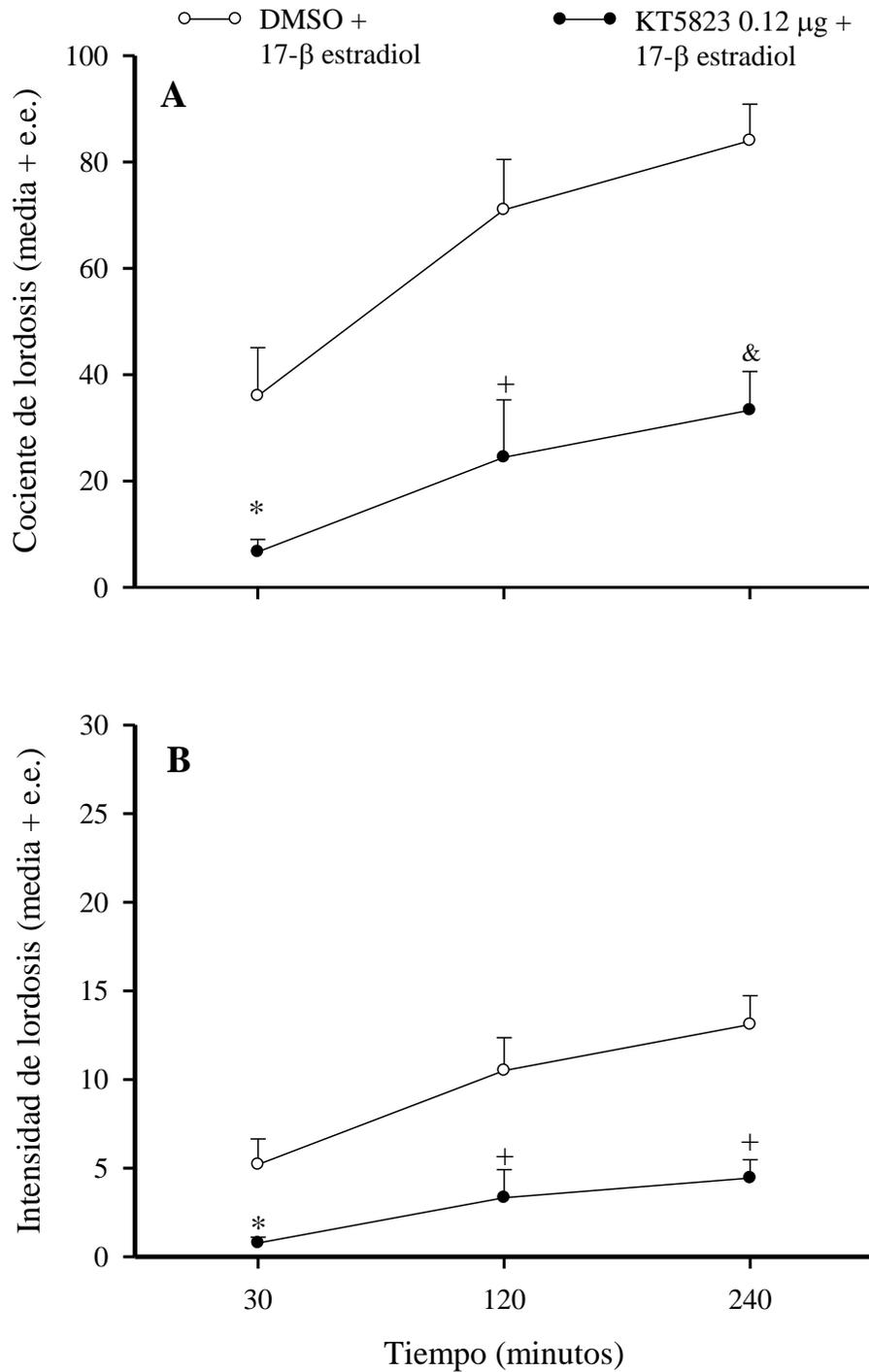


Figura 21. Efecto de la administración del inhibidor de la proteína cinasa G, KT5823, sobre el cociente (A) y la intensidad (B) de la lordosis inducidos por 2 ng de 17-β estradiol. El KT5823 disminuyó de manera significativa la respuesta inducida por el 17-β estradiol tanto a los 30 como a los 120 y los 240 minutos de la evaluación para ambos parámetros conductuales. El KT5823 fue inyectado 30 minutos antes de la administración del 17-β estradiol. [&] $p < 0.001$; ⁺ $p < 0.01$, ^{*} $p < 0.05$. U de Mann-Whitney.

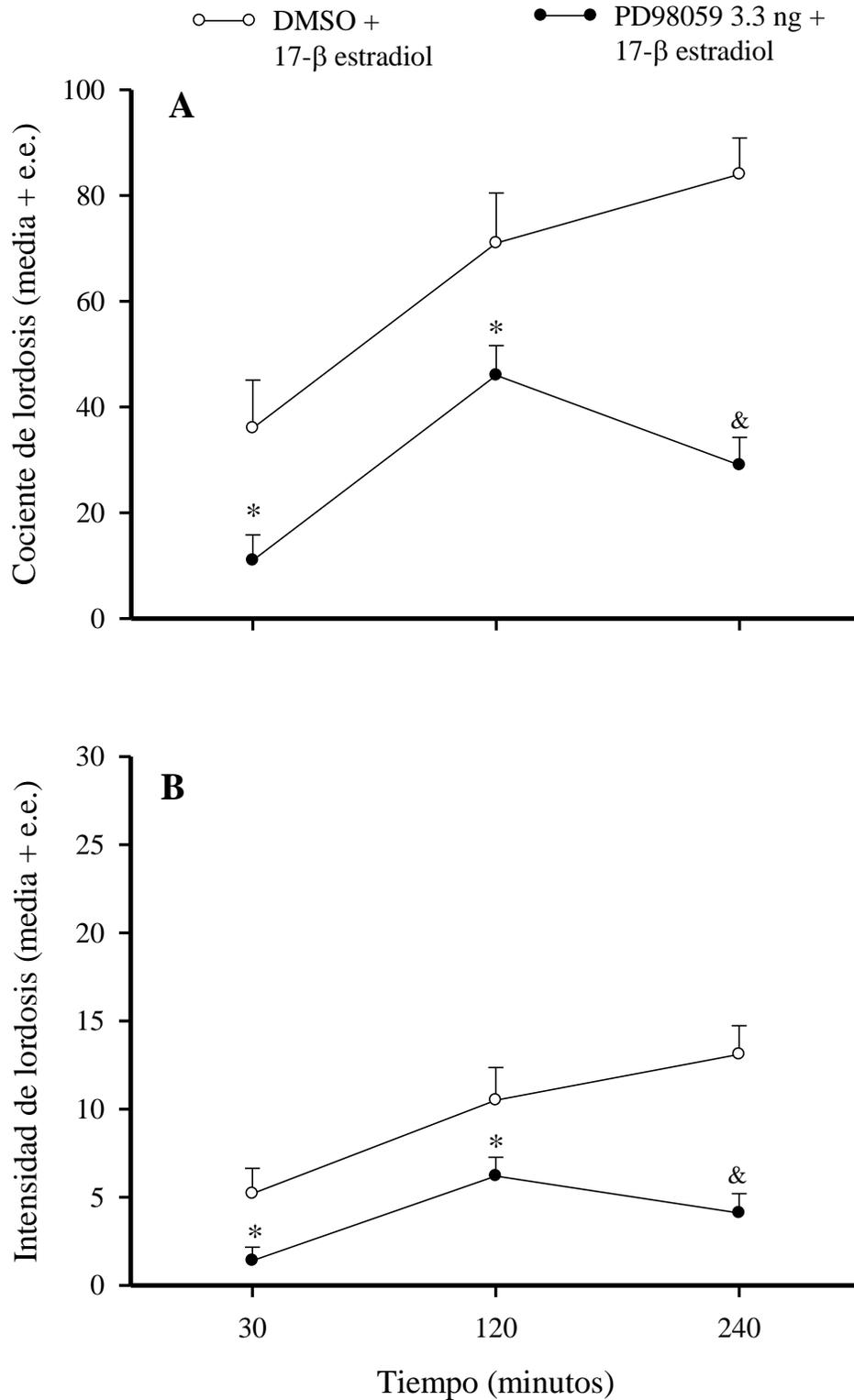


Figura 22. Efecto de la inyección icv de 3.3 ng de PD98059 sobre el LQ inducido por 2 ng de 17-β estradiol ($n = 10$). La inyección icv de 3.3 ng de PD98059 ($n = 10$) disminuyó tanto el LQ (panel A) como la IL (Panel B) inducidos por 2 ng de 17-β estradiol a los diferentes tiempos probados. & $p < 0.001$ * $p < 0.05$. U de Mann-Whitney.

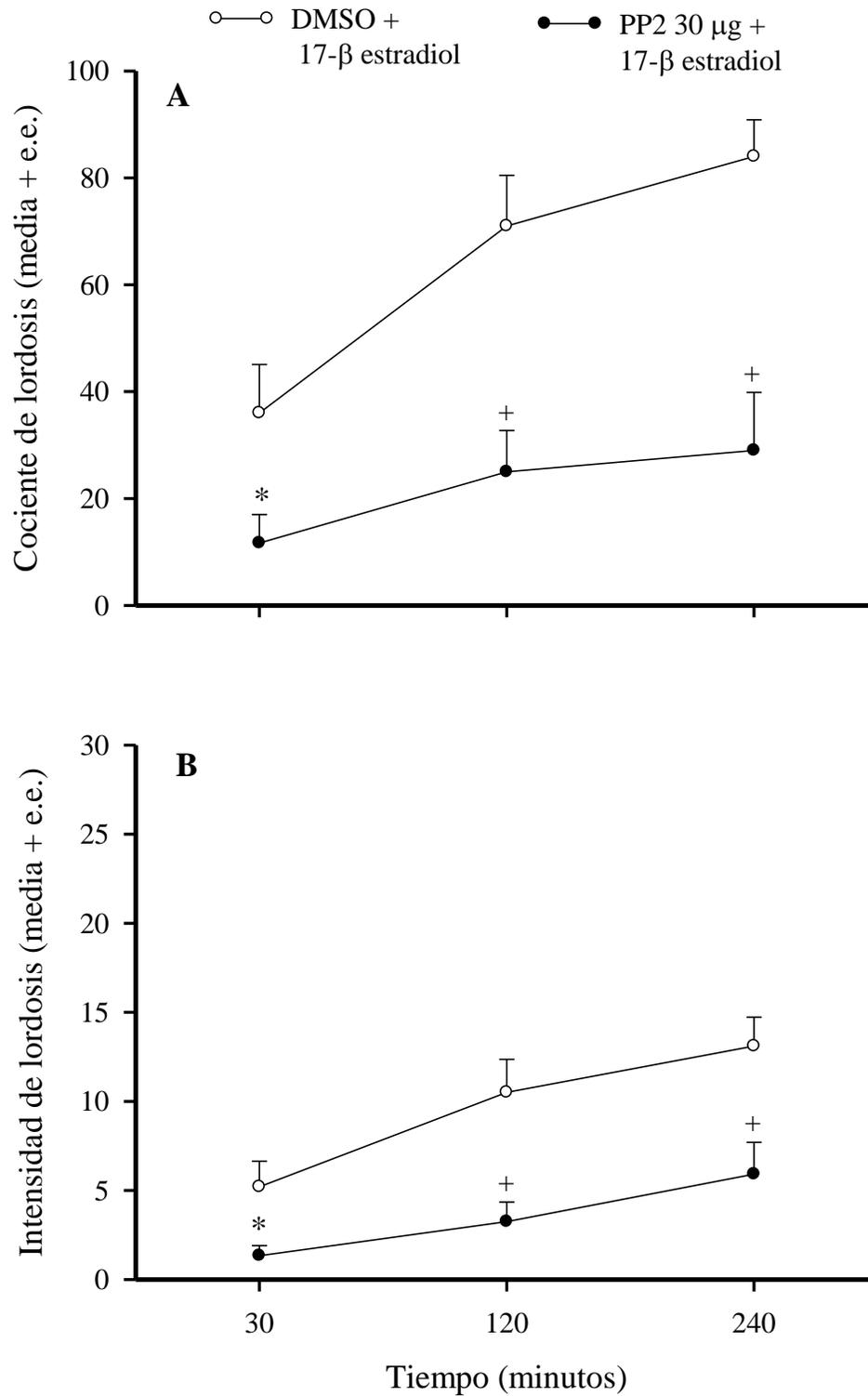


Figura 23. Efecto de la inyección del PP2, inhibidor de la Src, sobre el cociente (A) y la intensidad (B) de la lordosis inducidos por 2 ng de 17-β estradiol. El PP2 disminuyó de manera significativa el efecto del 17-β estradiol a los diferentes tiempos probados en ambos parámetros conductuales. El PP2 fue inyectado 30 minutos antes de la administración del 17-β estradiol. + $p < 0.01$, * $p < 0.05$. U de Mann-Whitney.

8. DISCUSIÓN

Los resultados presentados en esta tesis muestran tres diferentes hallazgos, (1) que la administración icv de dosis umbrales de 17- β estradiol induce la CL en ratas pretratadas con BE y sin P, (2) el RE y el RP participan en este evento conductual y (3) que la PKA, PKG, MAPK y la Src participan en la inducción de esta conducta, en el modelo de la rata OVX-pretratada con BE.

El mecanismo celular por el cual el 17- β estradiol activa la CL ha sido menos estudiado que el efecto sinérgico entre este esteroide y la progesterona, por lo que fue importante hacer este estudio ya que se conoce que las hembras de roedores al alcanzar la madurez sexual presentan un pico de 17- β estradiol cada 4 ó 5 días, seguido por un pico de progesterona (Freeman 2005) y solo se había propuesto que esa acción sinérgica era la encargada de disparar los diferentes componentes de la conducta de estro (lordosis y proceptividad).

Mediante la administración de dosis umbrales de 17- β estradiol (0.016, 0.08, 0.4, 2 ó 10 ng) a diferentes grupos de hembras OVX pretratadas con BE se construyó una curva dosis respuesta, la cual mostró que las tres dosis mayores empleadas indujeron la mejor respuesta de lordosis a los 120 y 240 minutos, sin embargo, como se puede apreciar en los resultados del experimento 1, la dosis de 2 ng fue la que indujo la mayor CL a los diferentes tiempos probados. El hecho de que el 17- β estradiol haya inducido dicha conducta coincide con los resultados publicados por otros grupos de investigación (Davidson 1968, Beyer y cols. 1971, Ross y cols. 1971, Zemlan y Adler 1977, Blaustein y cols. 1987, Micevych y Sinchak 2013, Jones y cols. 2013), en donde se confirma que la CL también puede ser inducida con solo 17- β estradiol, sin necesidad de la administración de progesterona, en nuestro modelo de la rata OVX y pretratada con BE bajo diferentes esquemas de tratamiento. En un estudio inicial realizado por Lisk (1962) se mostró que los implantes de BE en diversas áreas relacionadas con la CL, como el APOm y el HVM, indujeron dicha conducta. Resultados similares fueron publicados por Ross y cols. (1971) quienes al colocar implantes de 17- β estradiol en la FRM y el APOm de ratas OVX pretratadas con BE demostraron que la CL se incrementaba. Asimismo, Blaustein y cols. (1987), inyectaron dosis altas de BE (1 mg) a ratas OVX pretratadas con BE y encontraron que esta hormona inducía la CL. Además, la administración repetida de dosis bajas de BE (0.8 ó 3.2 μ g/día) por 4 días (Edwards y cols. 1968, Davidson y cols. 1968) o la inyección sc de diferentes estrógenos por 10 días (Beyer y cols. 1971) también inducen la CL. Kow y Pfaff (1975) mostraron que la inyección sc de una dosis baja de BE a la hora 0, seguida por la administración de 400 μ g de BE a las 48

horas induce la CL. Recientemente, los grupos de Micevych y Pfau han encontrado que la inyección de dosis bajas (5 ó 10 μg) de BE con un intervalo de 4 días entre cada una, sorprendentemente, induce la CL a partir de una tercera inyección (Micevych y Sinchak 2013, Jones y cols. 2013), lo cual mimetiza las condiciones del ciclo estral de la rata, ya que en estos roedores se ha observado un pico de 17- β estradiol cada 4 ó 5 días (Freeman y cols. 2005).

Es importante enfatizar que estos investigadores realizaron sus experimentos administrando diferentes dosis de BE o 17- β estradiol en protocolos distintos en el modelo de la rata OVX, encontrando que el tratamiento con dosis altas de BE o 17- β estradiol (μg a mg) indujo la lordosis (Davidson y cols. 1968, Beyer y cols. 1971, Ross y cols. 1971, Zemlan y Adler 1977, Blaustein y cols. 1987 Micevych y Sinchak 2013, Jones y cols. 2013).

Cabe señalar en que radica la importancia de nuestros resultados, si bien la CL con solo estrógenos ya había sido establecida, el realizar curva dosis-respuesta muestra la sensibilidad del sistema, ya que la inyección de dosis umbrales (ng) de 17- β estradiol a ratas OVX pretratadas con BE indujo CL y no así las dosis mayores (Domínguez-Ordóñez y cols. 2015). Este efecto paradójico, encontrado con nuestros resultados y aquellos trabajos en donde el 17- β estradiol induce la CL, solamente al ser administrado en dosis altas (500 mg ; Kow y Pfaff 1975) o dosis bajas (0.8 ó 3.2 $\mu\text{g}/\text{día}$; Edwards y cols. 1968, Davidson y cols. 1968) repetidas por varios días (5 a 10), podría deberse al hecho de que la eficacia del 17- β estradiol, para inducir la CL, es dependiente de la concentración que llega al tejido (en este caso, el cerebro), y no así de la dosis administrada (Eaton y cols. 1975, McEwen y cols. 1975). A diferencia de los eventos mediados por el receptor, los cuales alcanzan un límite máximo de efectividad cuando todos los receptores son ocupados, el metabolismo hepático que sufre el compuesto puede incrementar con el aumento de los niveles del fármaco en sangre (Kuhl 1990), resultando en niveles bajos de lordosis con las dosis mas altas.

Por otro lado, se ha correlacionado la cantidad de 17- β estradiol inyectado con algunas de las características de la CL inducida por progesterona, por ejemplo, la inyección con dosis crecientes de BE a ratas OVX provoca el incremento de la IL, el acortamiento de la latencia de la CL en respuesta a la monta de un macho, así como un incremento en la duración de la CL (Zemlan y Adler 1977). Una vez que se ha alcanzado la dosis umbral, la latencia de lordosis (intervalo de tiempo que transcurre entre la administración de 17- β estradiol y la manifestación de la CL) permanece más o menos constante (Zemlan y Adler 1977). En algunos casos, el nivel de expresión

de la CL parece tener poca o ninguna relación con la cantidad de 17- β estradiol acumulada en el tejido nervioso estudiado (Eaton y cols. 1975). Es decir, concentraciones elevadas de 17- β estradiol en el cerebro no están asociadas necesariamente con una CL vigorosa, lo que sugiere que la duración de la exposición, la retención de 17- β estradiol en el cerebro y los RE son factores muy importantes (McEwen y cols. 1975, Roy y Wade 1977, Blaustein y cols. 1979). Este podría ser el caso con los resultados obtenidos por diferentes grupos de investigación con el uso de dosis altas de 17- β estradiol y confirmados con nuestros resultados, en donde la administración de las tres dosis más altas indujo respuestas similares, lo que sugiere una saturación de los RE. Por lo tanto, nuestros datos están de acuerdo con los estudios pioneros que muestran que el 17- β estradiol puede sustituir a la progesterona en la inducción de la CL (Lisk 1962, Parsons y cols. 1984).

El 17- β estradiol no induce en su totalidad la expresión de la conducta de estro en ratas OVX pretratadas con BE, es decir, la proceptividad raramente se ha observado en aquellas ratas que solo han recibido a ese estrógeno (Domínguez-Ordóñez y cols. 2015), ya que se ha establecido que el aspecto proceptivo de la conducta de estro es meramente dependiente de la progesterona, más que por la dosis de 17- β estradiol administrada (Whalen 1974, Fadem y cols. 1977). Sin embargo, en el presente trabajo en donde las hembras mostraron clara CL con 17- β estradiol, sin progesterona, observamos muy poca proceptividad ya que como fue mencionado, la proceptividad es dependiente de la progesterona. Este fenómeno sugiere que los efectos que el 17- β estradiol ejerce sobre las áreas cerebrales relacionadas con la expresión de la CL son independientes de los que ejerce la progesterona (Domínguez-Ordóñez y cols. 2015), por lo que el mecanismo celular involucrado en la activación de las conductas proceptivas por esteroides no ha sido bien estudiado. Es claro que las áreas cerebrales que median la expresión de la lordosis son diferentes de esas involucradas en los aspectos motivacionales de la conducta de estro. Así, los efectos que ejerce el 17- β estradiol no son suficientes para activar todos los aspectos celulares que involucran el despliegue de esta conducta.

Interesantemente, el 17- β estradiol estimula la producción y liberación de feromonas en las diferentes hembras de mamíferos, las cuales resultan sexualmente atractivas para el macho, mientras que la progesterona se encarga de incrementar este efecto (Albert y cols. 1991). Por ello, la atractividad sexual es un aspecto de la conducta de estro que está influenciada por el estado endocrino en el que se encuentra la hembra, es decir, este aspecto de la conducta de estro varía de acuerdo a las diferentes fases del ciclo estral. Por lo que las feromonas secretadas por las hembras

que se encuentran en proestro son más atractivas para los machos, en cambio aquellas señales odoríferas de las hembras en diestro son las menos atractivas (Lucas y cols. 1982). Por lo tanto, los periodos de atraktividad sexual elevados se ven reflejados en el incremento de interacción sexual de la hembra con el macho. Así, la manifestación de esta conducta, en la rata, se encuentra restringida al periodo en el que la hembra está expuesta a niveles altos de 17- β estradiol y progesterona. Estos estímulos odoríferos provienen de la vagina (Carr y cols. 1962, Dopty y Dumber 1974, Gutiérrez-García y Contreras C 2002) y la orina (Lydell y Doty 1972 Gutiérrez-García y Contreras 2002) y son producidos por las glándulas prepuciales sebáceas (Orsulak y Gawienowski 1972).

Recientemente, Jones y cols., exploraron los efectos de la administración crónica de BE en ratas hembra de la cepa Long-Evans y Wistar. Los animales recibieron 8 dosis altas de BE (10 μ g) con un intervalo de 4 días entre cada aplicación, mostrando un LQ mucho más alto que las hembras que recibieron una sola inyección. Este dato sugiere que la administración repetida de BE induce un fenómeno que esos autores definieron como sensibilización (Jones y cols. 2013, Jones y Pfaus 2014).

Los resultados del experimento 2 muestran que la inyección icv de tamoxifén disminuyó tanto el LQ (Fig. 18A) como la IL (Fig. 18B) inducidos por 17- β estradiol (Domínguez-Ordóñez y cols. 2015). Estudios previos muestran que el tamoxifén, cuando fue administrado periféricamente o en el cerebro, a ratas hembra OVX, disminuyó la CL activada por progesterona (Etgen, 1979, Howard y cols. 1984, Etgen y Shamamian 1986). Sin embargo, implantes de tamoxifén en el HVM, pero no en el APOm redujeron la CL inducida por BE y progesterona (Howard y cols. 1984). Además, ambas rutas de administración produjeron una disminución en los RP y RE (Jordan y cols. 1977, Koseki y cols. 1977, Kurl y Morris 1978, Da Vies y cols. 1979, Etgen y Shamamian 1986), así como una reducción en la retención de [³H]17- β estradiol (Chazal y cols. 1975) y la expresión de la CL (Landau 1977, Roy y Wade 1977, Wade y Blaustein 1978, Etgen 1979).

La mayoría de estos estudios de disminución de la CL con tamoxifén se han realizado al administrar el antiestrógeno alrededor del tiempo de inyección del pretratamiento con BE (hora 0; Jordan y cols. 1977, Koseki y cols. 1977, Kurl y Morris 1978, Da Vies y cols. 1979, Etgen y Shamamian 1986), no obstante, en otros estudios, cuando el antiestrógeno es inyectado

inmediatamente antes de la inyección de la progesterona (hora 40) en ratas pretratadas con BE (Feder y Morin 1974, Blaustein y cols. 1979), se ha obtenido la misma disminución sobre la CL.

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha encontrado resultados similares sobre la CL en ratas OVX pretratadas con BE al ser inyectadas con 5 μ g de tamoxifén por vía icv 30 minutos antes de la inyección de progestinas, GnRH, prostaglandina E2 y leptina (Lima-Hernández y cols. 2014). Estos resultados concuerdan con trabajos previos (Blaustein y Wade 1977, Blaustein y cols. 1979), donde la CL inducida por progesterona en hembras de ratas y cobayoss pretratadas con BE fue disminuida por la administración del antagonista de los RE alrededor de la hora de inyección de la progesterona. Estos datos apoyan categóricamente la participación de los RE que son sintetizados por el pretratamiento con BE en la CL inducida por 17- β estradiol. Los resultados de este trabajo coinciden con los aspectos que se han señalado ocurren en condiciones naturales, ya que durante el proestro los niveles de 17- β estradiol son altos (momento en que las ratas despliegan su conducta de estro; Powers 1970, Zemlan y Adler 1977). En estas condiciones los RE pueden ser activados por 17- β estradiol endógeno alrededor del tiempo de la inducción de la CL. Éste fenómeno se pudiera presentar en el caso de las ratas OVX, ya que muestran niveles bajos de 17- β estradiol circulante después de la inyección sistémica de BE, lo que induce la activación de niveles bajos de RE aún después de las 48 horas (Schwartz y cols. 1979). Además de que esos niveles en la concentración de los RE pudieran ser suficientes para que se produzca la CL inducida con solo 17- β estradiol cuando se inyecta icv. Esta idea es apoyada por el hecho de que el tamoxifén disminuyó la CL inducida por este esteroide (Domínguez-Ordóñez y cols. 2015).

Actualmente, existe poca información de la participación de los RE- α y RE- β en la regulación de la CL. Sin embargo, en estudios realizados en hembras Knock-out para el RE- α (RE- α KO), se encontró que estas hembras expresan un menor nivel de CL que las hembras intactas (Kudwa y Rissman 2003), las cuales si expresan dicho receptor, mientras que las hembras Knock-out para el RE- β (RE- β KO) mostraron altos niveles de CL (Ogawa y cols. 1999, Kudwa y Rissman 2003), lo que señala que la CL es dependiente de la expresión del RE- α y no del RE- β . Sin embargo, los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación han mostrado que la inyección de PPT y DPN, agonistas selectivos del RE- α y RE- β respectivamente, inducen la CL en la rata OVX pretratada con BE (Domínguez-Ordóñez y cols. 2016), lo que sugiere que tanto el RE- α como el RE- β juegan un papel importante en la inducción de la CL por 17- β estradiol. Si

bien, estos resultados difieren con los obtenidos en ratones, se requieren de más estudios para poder determinar si existe un efecto diferencial de la participación de los RE en la regulación de la CL en roedores.

Por otro lado, el papel que juega el RP sobre la expresión de la CL en roedores ha tomado gran importancia, proponiéndose a éste como el mediador molecular común por el cual una gran variedad de compuestos con diferentes estructuras químicas (progesterona, GnRH, prostaglandina E2, leptina, dopamina) o por la estimulación vagino-cervical inducen la expresión de la CL (Beyer y cols. 2003, Mani y Portillo 2010). Se llegó a esta conclusión debido a una serie de estudios donde se utilizó como herramienta farmacológica a la antiprogestina RU486, la cual disminuyó el efecto inductor de dichos agentes lordogénicos en ratas OVX-pretratadas con BE (González-Mariscal y cols. 1989, Mani y cols. 1994, Beyer y cols. 1995, Beyer y cols. 1997, Auger y cols. 1997, Beyer y cols. 2003, García-Juárez y cols. 2011, Mani y Blaustein, 2012). Sin embargo, los efectos de esta antiprogestina sobre la CL inducida por 17- β estradiol en ratas OVX-pretratadas con BE han sido controversiales, los cuales pueden ser atribuibles a los diferentes protocolos de tratamiento usados. Por ejemplo, el RU486 fue inefectivo en disminuir la CL en ratas OVX tratadas con dosis repetidas de BE (3 μ g BE/día por 7 días; Beyer y cols. 1995). Resultados similares fueron encontrados por Blaustein y cols. (1987), y recientemente por Micevych y cols. (2008), en donde el RU486 no disminuyó la CL inducida por la exposición crónica a 17- β estradiol o por una segunda administración de 17- β estradiol en ratas OVX-pretratadas con BE.

Interesantemente, los resultados obtenidos en el experimento 3 de esta tesis, muestran que la inyección de 5 μ g de RU486 disminuyó la CL inducida por la administración de 17- β estradiol, sugiriendo que el 17- β estradiol induce la CL, al menos en parte, a través de la activación del RP. Este hallazgo es consistente con los resultados publicados por Parsons y cols. (1980), al utilizar un paradigma experimental diferente, ya que la administración de una dosis elevada de 17- β estradiol indujo CL pero también causó la acumulación celular de RP en el HVM y APOm a las dos horas después de su inyección, lo que claramente demuestra la participación de ese receptor. Además, resultados recientes, utilizando un modelo molecular, mostraron que la energía de unión del 17- β estradiol con los monómeros de RP-A fue considerablemente mayor que la del dímero RP-AB (Hasan y cols. 2011). Así, nuestros resultados también apoyan la idea de que la inducción de la CL por 17- β estradiol es mediada por el RP, ya que la administración icv de oligonucleótidos antisentido para el RP (RP A+B As y RP-B As) disminuyó la CL inducida por dosis repetidas de

BE (Domínguez-Ordóñez y cols. 2015). En apoyo a estos resultados es el hecho de que la CL inducida por progestinas reducidas en el anillo A, las cuales tienen poca o ninguna afinidad por el RP, fue también disminuida por la administración de oligonucleótidos antisentido para el RP (RP A+B As y RP-B As; Guerra-Araiza y cols. 2009). Por lo tanto, la administración de oligonucleótidos antisentido para el RP, antes de cada inyección de BE podría disminuir la síntesis del RP y en consecuencia la CL inducida por una variedad de compuestos. Además, estudios realizados con la técnica de western blot (Guerra-Araiza y cols. 2009) sustentan esta idea, ya que se encontró que el contenido de ambas isoformas del RP en el HVM y APOm fue disminuido por la administración de oligonucleótidos antisentido para el RP. Aunque los datos sugieren que el RP está involucrado en la inducción de la CL por 17- β estradiol, el mecanismo a través del cual esto ocurre no ha sido bien establecido.

Un problema sustancial al cual nos enfrentamos es el entender el mecanismo celular por el cual diferentes receptores a esteroides interactúan en la misma célula para disparar una cascada de señalización celular en respuesta a la unión de la hormona. Con base a esto, en el presente trabajo, encontramos que la inyección de RpcAMPs (inhibidor de la PKA), 30 minutos antes de la inyección de 2 ng de 17- β estradiol, redujo la CL inducida por esta hormona a los diferentes tiempos probados (Figura 20). Interesantemente, se ha encontrado que el 17- β estradiol activa a la PKA tanto en neuronas del hipocampo (Shingo y Kito 2005) como en astrocitos (Chen y cols. 2014), por lo que esta proteína pudiera estar estrechamente relacionada con la expresión de la CL inducida por 17- β estradiol. Así, los resultados de esta tesis concuerdan con los datos obtenidos previamente en nuestro laboratorio, ya que el RpcAMPs disminuyó la CL inducida por diferentes agentes lordogénicos, como progesterona, 5 α -DHP (González-Flores y cols. 2006), GnRH, AMPc, prostaglandina E2 (Ramírez-orduña y cols. 2007), estimulación vagino-cervical (González-Flores y cols. 2008) y leptina (García-Juárez y cols. 2013).

El mecanismo por el cual esta cinasa podría estar siendo activada y posteriormente activar la CL ha sido explorado por diferentes grupos de investigación (Beyer y cols. 2003, González-Flores y cols. 2006, Micevych y cols. 2015). Por ejemplo, el 17- β estradiol al unirse a un receptor localizado en la membrana, el GPER-1 (que se encuentra en neuronas GnRH), puede activar al sistema adenilato ciclasa-AMPc (Terasawa Y Kenealy 2012), el cual puede estimular directamente la liberación de GnRH, este último, al ser liberado puede actuar en el receptor membranal GnRH-1 asociado a proteína G. Así, mediante el incremento en la producción de

segundos mensajeros y la activación de cinasas, el 17- β estradiol puede, teóricamente, inducir la expresión de la CL activando al RP en un mecanismo de tipo ligando independiente. Se conoce que el AMPc es indispensable para la activación de la PKA y se ha encontrado que los niveles hipotalámicos de AMPc se encuentran elevados en la noche del proestro, coincidiendo con la manifestación de la CL (kimura y cols. 1980). Además, los análogos del AMPc e inhibidores de fosfodiesterasas también inducen la CL (Kow y cols. 1994, Beyer y González-Mariscal 1986, Whalen y Lauber 1986).

Una vía intracelular probable en la activación de la CL podría llevarse a cabo a través del sistema AMPc/PKA con el subsecuente reclutamiento del inhibidor de proteínas fosfatasas DARP-32 (Mani y O'Malley 2009, Mani y Portillo 2010) como en el caso de la progesterona y dopamina. Esta cascada de eventos daría como resultado la activación de DARP-32 y una disminución de la defosforilación del RP y/o sus coactivadores asociados (Mani y O'Malley 2009, Mani y Portillo 2010).

Micevych y cols. (2015), han propuesto un mecanismo alternativo en donde el 17- β estradiol podría estar induciendo la expresión de la CL a través de la activación de la PKA en los astrocitos, con la subsecuente síntesis y secreción de neuroprogesterona (Chen y cols. 2014). Este evento puede llevarse a cabo a través de los siguientes eventos; 1) el 17- β estradiol induce un incremento de $[Ca^{2+}]_i$, el cual activa a la adenilato ciclasa-1 para producir AMP cíclico (AMPc), y así activar a la PKA (Micevych y cols. 2015). La PKA estaría mediando la velocidad de síntesis de esteroides, es decir, el transporte de colesterol hacia la matriz mitocondrial a través de la activación de la proteína reguladora de la síntesis de esteroides y la proteína translocadora (Papadopoulos y cols. 2006). En la mitocondria, el colesterol es convertido a pregnanolona por la enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol, P450 scc. La pregnanolona resultante es convertida por la 3- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3- β HSD) a neuroprogesterona, la cual podría activar al RP (Micevych y cols. 2015).

Los resultados obtenidos con la administración del inhibidor de la PKG, el KT582, muestran que esta cinasa participa en la expresión de la CL inducida por 17- β estradiol, ya que la inyección de ese inhibidor disminuyó de manera significativa tanto el LQ como el LS inducido por 2 ng de 17- β estradiol a los 30, 120 y 240 minutos (Figura 21). Estos resultados coinciden con los publicados anteriormente, en donde la inyección del KT5823 disminuyó el efecto de diferentes agentes lordogénicos, como la leptina (García-Juárez y cols. 2012), la progesterona, la 5 α -

dihidroprogesterona, la 5 α ,3 α -pregnanolona. (González-Flores y cols. 2004), la estimulación vagino-cervical (González-Flores y cols. 2007), el AMPc y la prostaglandina E2 (González-Flores y cols. 2009).

La inducción de la CL a través de la activación de la PKG por 17- β estradiol podría ser mediada a través de la activación de la vía del óxido nítrico, ya que se ha encontrado que la inyección de 3 μ g de BE a ratas OVX incrementa los niveles del ARNm que codifica para la síntesis de la sintasa del óxido nítrico neuronal (SON), enzima encargada de catalizar la conversión de L-arginina a óxido nítrico y citrulina en presencia de oxígeno y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida, NADPH (Snyder 1992), en neuronas del HVM (una de las áreas más importantes en la inducción de la CL; Cecatelli y cols. 1996). Esta enzima es un importante mediador de la vía del óxido nítrico en la CL, ya que en estudios realizados por Sica y cols. (2009), se ha encontrado que la expresión de la SON en núcleos hipotalámicos de hembras de ratón estaba involucrada en el control de la reproducción, y que se encontraba bajo el control de hormonas gonadales. Además, observaron que la expresión de la SON varía de acuerdo a los niveles hormonales que se producen durante el ciclo estral, los cuales se correlacionan con un incremento en la inmunorreactividad de la enzima, por ejemplo, durante el estro en el área preóptica, sin embargo, durante el proestro el incremento sólo se encontró en el núcleo arqueado (Sica y cols. 2009). Además, el tratamiento con inhibidores de la enzima atenúa la lordosis inducida por progesterona; mientras que la administración de un donador de óxido nítrico induce esta conducta (Mani y cols. 1994a).

Adicionalmente, se conoce que el óxido nítrico, en el sistema nervioso central, induce la liberación de GnRH, lo que se piensa pudiera ser un evento relacionado con la expresión de la CL (Mani y cols. 1994a), mientras que los efectos periféricos del óxido nítrico, al incrementar los niveles de GMPc induce la ovulación (McCann y cols. 1999). Asimismo, se ha encontrado que la vía óxido nítrico-GMPc-proteína cinasa G, está involucrada en la activación de la CL inducida por progesterona y algunos de sus metabolitos reducidos en el anillo A (González-Flores y Etgen, 2004), así como la inducida por GnRH, prostaglandina E2 y dibutiril AMPc (González-Flores y cols. 2009), lo que apoya la participación de ésta vía de señalización en la regulación de la CL. Conjuntamente, altos niveles de GMPc se han encontrado en el hipotálamo de ratas hembra durante el proestro (Kimura y cols. 1980), y se ha publicado que los derivados de guanina, como el GTP y GMPc inducen la CL en el modelo de la rata OVX (Fernández-Guasti y cols. 1983, Chu y Etgen,

1997). Por ejemplo, la inyección de 8-bromo-GMPc induce la CL en la rata OVX pretratada con BE (Chu y cols. 1999). Así, en el presente trabajo, el hecho de que el KT5823 haya disminuido la CL inducida por 17- β estradiol, apoya la posibilidad de que este último compuesto eleve los niveles de GMPc en las áreas cerebrales relacionadas con la CL, el cual al unirse a los sitios reguladores de la PKG active a esa cinasa. Interesantemente, los niveles hipotalámicos de GMPc se incrementan durante el proestro en la rata intacta (Kimura y cols. 1980), después del tratamiento con 17- β estradiol y progesterona en la rata OVX (Chu y Etgen, 1997) o después de la aplicación de micropelets de 17- β estradiol en la coneja intacta (Palmon y cols. 1998). Sin embargo, la PKG no fosforila al RP (Chauchereau y cols. 1994) pero si la MAPK (Lange y cols. 1998, 2000, Zhang y cols. 1995, 1997), hecho que abre la interesante posibilidad de que la PKG pueda activar a la MAPK y así activar la lordosis.

Esta idea es apoyada por los resultados que se obtuvieron en el experimento 4 (Figura 22), en donde la infusión del PD98059 (inhibidor de la MAPK) en el ventrículo lateral derecho, disminuyó la CL inducida por 17- β estradiol a los diferentes tiempos probados. Estos resultados sugieren que la MAPK podría ser una molécula integradora de la multitud de señales extracelulares que estimulan las estructuras nerviosas relacionadas con el despliegue de la CL. Así, en experimentos realizados en condiciones *in vitro*, se ha probado que esta cinasa fosforila al RP (Zhang y Snyder 1995, Lange y cols. 2000, Shen y cols. 2001), lo que vuelve a proponer a esta proteína como el mediador molecular común por el cual diversos compuestos con diferentes estructuras químicas (Beyer y cols. 1997, Beyer y cols. 2003), incluyendo al 17- β estradiol (Domínguez-Ordóñez y cols. 2015) activan a la CL. Además, se ha encontrado que la adición de 10 μ g/ml de 17- β estradiol a cultivos de neuronas del hipocampo activa a la MAPK a los 10 minutos después de ser agregado (Wu y cols. 2005).

En nuestro laboratorio hemos mostrado que la vía de señalización de la MAPK regula la expresión de la CL, a través de la administración del PD98059, ya que este compuesto disminuyó la expresión de dicha conducta, la cual fue inducida por progestinas reducidas en el anillo A, el 8-bromo-GMPc (González-Flores y cols. 2004b), GnRH y prostaglandina E2 (González-Flores y cols. 2009). Además, se ha demostrado que la administración *in vitro* de un análogo del GMPc, activa a la MAPK (Ho y cols. 1999, Komalavias y cols. 1999), lo que concuerda con la inducción de la CL por GTP o GMPc, en ratas OVX pretratadas con BE (Fernández-Guasti y cols. 1983, Chu y Etgen, 1997). Igualmente, se sabe que la activación de la MAPK en el hipotálamo varía de

acuerdo con las condiciones hormonales, ya que la OVX provoca la reducción de su actividad, mientras que el tratamiento con 17- β estradiol incrementa sus niveles (Bi y cols. 2001, Singh 2001), sugiriendo la posible interacción entre la vía que involucra al GMPc y la activación de la MAPK.

Además, existen diversos receptores acoplados a proteínas G, que inducen la CL en ratas OVX previamente estrogenizadas y que pueden activar la cascada de señalización de la MAPK (Silberbach y Roberts 2001) entre los que se encuentran los receptores de GnRH ubicados en la hipófisis (Cheng y Leung 2000).

Una de las acciones extranucleares mejor caracterizadas, es la activación de la vía de señalización de la Src/MAPK, a través de la cual el RE y RP interactúan dentro de las células en un modo dependiente de la hormona agonista (Migliaccio y cols. 1998, Edwards y cols. 2003, Boonyaratanakornkit y cols. 2008). Los resultados del experimento 4 apoyan la idea de que el 17- β estradiol induce la CL al activar la vía de señalización de la Src. Como se muestra en la figura 23, el PP2 (inhibidor de la Src) disminuyó el efecto del 17- β estradiol sobre la CL en ratas OVX pretratadas con BE. Diversas evidencias indican que el RE activado por el 17- β estradiol se asocia con la Src mediante la interacción del DUL con la fosofotirosina-537 del dominio SH2 de la Src, mientras que los aminoácidos 421 y 428 del dominio A/B del RP se unen con el dominio SH3 de la Src, promoviendo la cascada de señalización de la Src-Raf-MAPK (Migliaccio y cols. 1998, Boonyaratanakornkit y cols. 2008, Lima-Hernández y cols. 2012). Alternativamente, se ha encontrado que dos regiones dentro del RP interactúan directamente con el RE (dominios I y II de interacción del RE). Por lo que parece que el RP es necesario para la interacción del RE con la Src, así como para la subsecuente activación de la MAPK.

Este mecanismo podría explicar por qué las ratas cuya expresión de RP ha sido suprimida por la administración de oligonucleótidos antisentido para el RP no expresan CL en respuesta a dosis repetidas de BE. Así, la participación del complejo RP-Src en la CL inducida por 17- β estradiol no ha sido bien esclarecida. Sin embargo, se propone que este agente químico, podría actuar directamente sobre cualquier neurona donde se ubique el complejo RP-Src o en neuronas que compartan conexiones sinápticas con las anteriores. La activación de varias neuronas podría liberar neurotransmisores capaces de estimular la CL, ej., dopamina, norepinefrina, acetilcolina, etc. (ver revisiones, Beyer y González-Mariscal 1986, Beyer y cols. 2003, Blaustein 2003, Etgen, 2003, Mani y Portillo 2010) y activar a las neuronas que contienen el complejo RE-RP-Src.

Existe la posibilidad de que el 17- β estradiol actúe directamente sobre las neuronas que expresan RP. Esta idea es apoyada por el hallazgo de que el 17- β estradiol al ser implantado en forma de cristales en el HVM (Lisk 1962), una región con alta densidad de neuronas que contienen RP, induce la CL. Evidencias obtenidas en estudios en diversos sistemas celulares sugieren que los receptores acoplados a proteína G, a través de la activación de cinasas, tales como la PKA y PKC, pueden activar a los receptores a tirosina cinasas y el complejo Src-MAPK. (Lange y cols. 1998, Migliaccio y cols. 1998, Lange 2004).

El RP induce una activación casi inmediata, de la Src-MAPK (2-5 minutos) lo cual disminuye a los 10 minutos (Boonyaratanakornkit y cols. 2001, Migliaccio y cols. 1998). Esta activación transitoria produce efectos no transcripcionales sobre canales iónicos, como aquellos asociados con receptores inotrópicos a glutamato, GABA y acetilcolina (Charpantier y cols. 2005, Choi y cols. 2011, Groveman y cols. 2012), así como a canales iónicos dependientes de voltaje (Endoh 2005). Además, la vía de señalización del RE-RP-Src-MAPK también puede modular al RP nuclear a través de la fosforilación de la serina 294, un proceso que incrementa la actividad transcripcional del RP para su degradación subsecuente por el proteosoma 26S (Favre y cols. 2005, Lange y cols. 1998, Qiu y Lange 2003).

Los mecanismos a través de los cuales el 17- β estradiol activa a los RE y estimula la CL, en ratas OVX pretratadas con BE aún no son claros. Aunque no se puede excluir la posibilidad de que los RE actúen sobre el genoma activado clásicamente por 17- β estradiol, éstos son esenciales tanto para activar mecanismos rápidos así como para inducir un efecto tardío en la CL, por lo que se pudiera pensar la existencia de mecanismos alternativos. Por lo tanto, existe la probabilidad de que el 17- β estradiol active dos procesos controlados por los RE temporal y mecánicamente distintos. Por ejemplo, el primero sería un efecto de pretratamiento en el cual el 17- β estradiol administrado a ratas OVX se une a los RE nucleares clásicos, en donde este complejo hormona-receptor activara la maquinaria transcripcional asociada con el ADN e induciendo la síntesis de una variedad de proteínas, entre ellos al RP (MacLusky y McEwen, 1978; Moguilewsky y Raynaud, 1979) y al propio RE (Robertson y cols. 2002). El segundo efecto se refiere a la propia activación del RE y el RP por fosforilación inducida por 17- β estradiol. Se conoce que ambos receptores viajan rápidamente desde el núcleo al citoplasma e interactúan con la tirosina cinasa Src, la cual se encuentra unida a la membrana celular. Se propone que el RE está asociado con la Src por la interacción de la fosfotirosina-537, ubicada en el dominio de unión al ligando del RE

con el dominio SH2 de la Src, mientras que el RP se une a través de sus aminoácidos 421 y 428, ubicados en el extremo N-terminal, dominio SH3 de la Src, promoviendo la cascada de fosforilación de la Src-Raf-MAPK. La activación de este trímero, ej., RE-RP-Src, puede ocurrir por la unión de ligandos naturales como el 17- β estradiol, la P o por agentes no esteroideos (Boonyaratanakornkit y cols. 2008, Chen y cols. 2009, Chen y cols. 2010, Lima-Hernández y cols. 2012, Migliaccio y cols. 2007, Migliaccio y cols. 1998). Este trímero, se puede formar en algunas células que expresan tanto RE como RP, incluyendo, presumiblemente a las neuronas que regulan la CL (Balleine y cols. 1999, Gréco y cols. 2001, Järvinen y cols. 2000).

Se han descrito interacciones físicas entre el RE y el RP, que ocurren en el citoplasma (Ballare y cols. 2003, Boonyaratanakornkit y cols. 2001, Hagan y cols. 2009, Migliaccio y cols. 1998). Por lo que el 17- β estradiol podría activar la vía de la Src-MAPK asociada con el dímero RE-RP, induciendo rápidamente la CL por la vía de un mecanismo no genómico. Esta idea es apoyada por resultados obtenidos en nuestro laboratorio, en los cuales la antiprogestina, RU486, así como los inhibidores de la MAPK y la Src (PD98059 y el PP2 respectivamente) disminuyeron la CL inducida por 17- β estradiol o por compuestos con diversas estructuras químicas, dentro de las que se incluyen: progestinas reducidas en el anillo A, la GnRH y la prostaglandina E2, así como por la EVC en el modelo de la rata OVX-pretratada con BE (Beyer y cols. 1995, Beyer y cols. 1997, González-Flores y cols. 2010, González-Flores y cols. 2008, González-Flores y cols. 2009, González-Flores y cols. 2004b, Lima-Hernández y cols. 2012). Por lo tanto, hemos propuesto que éste es el sistema que podrían estar utilizando una variedad de compuestos que inducen la CL a pesar de su baja afinidad por el RE y RP y que su efecto es disminuido por sus antagonistas. Así, los resultados de esta tesis sugieren que el 17- β estradiol puede inducir la CL al activar al RP a través de un mecanismo ligando independiente, debido a la baja afinidad del 17- β estradiol por el RP.

Esta idea es apoyada por el hecho de que el RE y el RP interactúan en el citoplasma y la membrana celular activando distintos mecanismos de señalización, incluyendo la PKA, PKG, MAPK y Src. Así, este sería otro mecanismo clásico de entrecruzamiento (crosstalk) inicialmente propuesto por Beyer y cols. (1980), en el cual se establecen las bases para la activación de la lordosis por agentes con diversas estructuras químicas. Los efectos de estos compuestos convergen en el receptor a progesterona, mismo que para ser activado requiere de ser previamente fosforilado (O'Malley y cols. 1991).

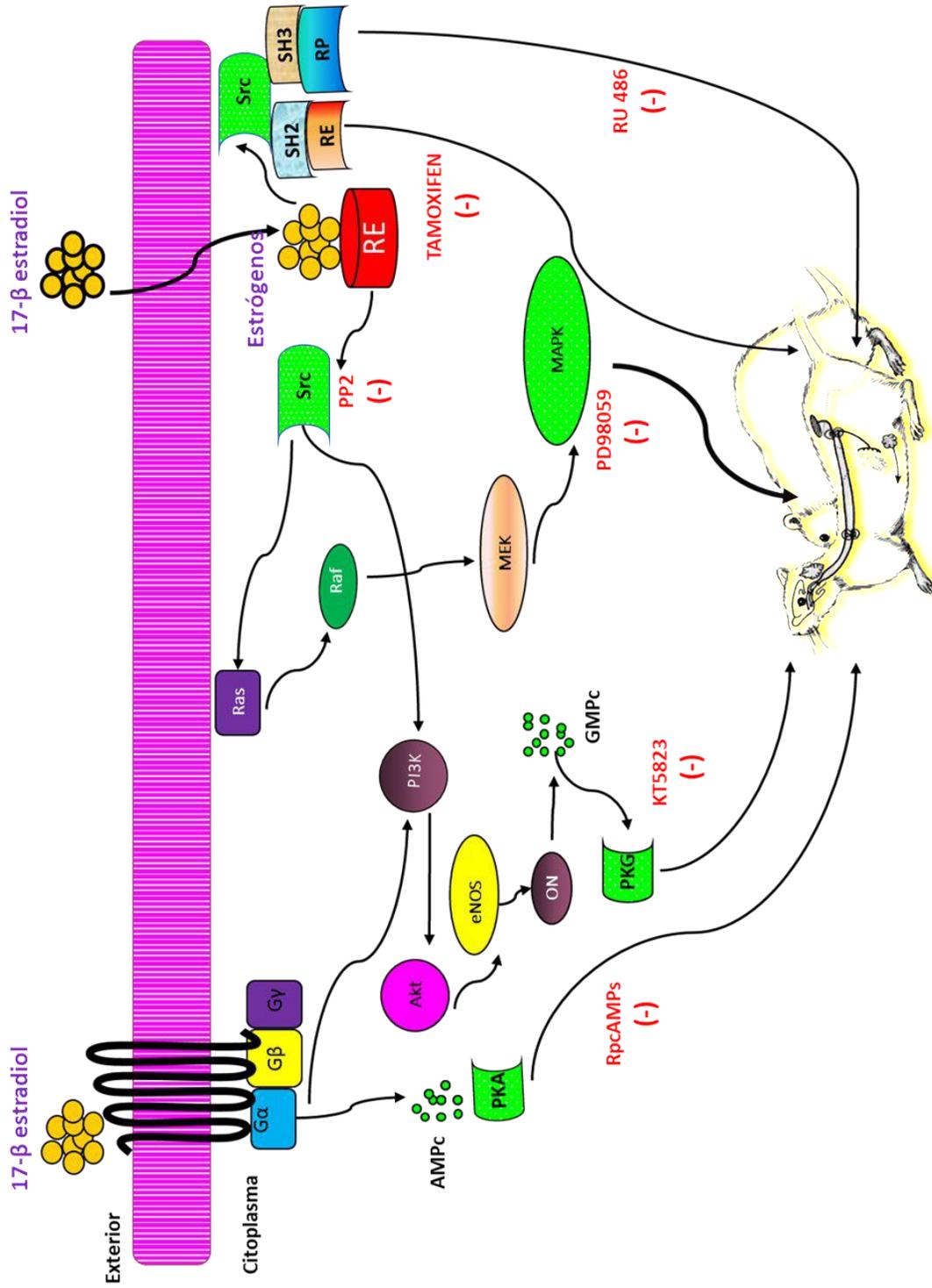


Figura 24. Esquema general de la acción del 17-β estradiol en la inducción de la CL. La figura muestra las diferentes proteínas activadas por el 17-β estradiol y las posibles vías de señalización que llevan a la activación del RP en la facilitación de la conducta de lordosis. (-) indica el efecto del antagonista del RP, el modulador selectivo de los RE y los inhibidores de las proteínas cinasas A, G, MAPK y Src en esta conducta.

9. CONCLUSIONES

1. El 17- β estradiol, al ser administrado en dosis cercanas a las concentraciones fisiológicas (pg), a ratas OVX-pretratadas con BE, induce la CL en un periodo de tiempo corto (30 a 240 minutos), ya que las dosis de 0.4, 2 y 10 ng de 17- β estradiol indujeron clara CL, sin embargo la dosis de 2 ng fue la que indujo la CL a los diferentes tiempos probados. Este hecho sugiere que esta hormona no sólo es indispensable durante el periodo de pretratamiento para la CL sino que también funciona como un agente lordogénico.
2. Los receptores a estrógenos se encuentran involucrados en la inducción de la CL por 17- β estradiol, ya que la administración de 5 μ g de tamoxifén disminuyó el despliegue de este evento conductual. Por lo tanto, este hallazgo sugiere que los RE no solo actúan como factores de transcripción para la síntesis de ARNm que codifica para distintas proteínas, entre ellas el RP, sino que son mediadores de la CL inducida por 17- β estradiol.
3. El RP también se encuentra involucrado en la inducción de la CL por 17- β estradiol, ya que la infusión de 5 μ g de RU486 redujo la inducción de esta conducta. Lo que fortalece aún más el papel del RP como mediador común de la conducta de lordosis en la rata OVX-pretratada con BE.
4. La PKA es importante en la inducción de la CL por 17- β estradiol, ya que la inyección de 2 μ g de Rp-cAMPs disminuyó el despliegue de esta conducta a los diferentes tiempos probados, lo cual muestra la participación de dicha enzima en las vías de señalización activadas por 17- β estradiol en el despliegue de la conducta de lordosis.
5. La PKG modula la CL inducida por 17- β estradiol, ya que la inyección de 0.12 μ g de KT5823 redujo de manera significativa la expresión de esta conducta, en el modelo de la rata ovariectomizada pretratada con BE. Además, la participación de esta cinasa en la CL es apoyada por trabajos anteriores, donde la inyección del KT5823 disminuyó dicha conducta inducida por progesterona, progestinas reducidas en el anillo A y leptina, por lo que la PKG es mediadora relevante de la CL.
6. La MAPK se encuentra involucrada en la activación de la CL por 17- β estradiol, ya que la inyección de 3.3 μ g de PD98059 disminuyó este evento conductual inducido por esta hormona a los tres tiempos probados; por ello, probablemente sea la integradora de las señales involucradas para la inducción de la CL por 17- β estradiol.

7. La Src es una proteína cinasa involucrada en la inducción de la CL por 17- β estradiol, ya que la inyección de 30 μ g de PP2 disminuyó este evento conductual a los diferentes tiempos probados.

10. PERSPECTIVAS

El hecho de que el 17- β estradiol induce CL en el modelo de la rata OVX-pretratada con BE, nos permite pensar en los posibles mecanismos moleculares que esta hormona utiliza. Uno de estos mecanismos es la interacción que tienen tanto el RE α como el RE β con las diferentes proteínas cinasas, cuyos inhibidores disminuyeron la CL en esta tesis, para ello se podría administrar vía icv los inhibidores de estas cinasas 30 minutos antes de la inyección icv de los agonistas de los RE- α y RE- β . Un segundo mecanismo sería la participación del receptor membranal de estrógenos, el GPER-1, y la posible vía de señalización que estaría participando en la inducción de la CL por 17- β estradiol. Finalmente, un tercer mecanismo podría ser la vía del óxido nítrico activada por 17- β estradiol, ya que existen suficientes evidencias que apoyan la probable participación de esta vía en la inducción de la CL.

11. REFERENCIAS

- Abram CL y Courtneidge SA. 2000. Src family tyrosine kinases and growth factor signaling. *Exp Cell Res* 254: 1-13.
- Acosta-Martínez M, Gonzalez-Flores O y Etgen AM. 2006. The role of progesterin receptors and the mitogen-activated protein kinase pathway in delta opioid receptor facilitation of female reproductive behaviors. *Horm Behav* 49: 458-462.
- Adam HK, Patterson JS y Kemp JV. 1980. Studies on the metabolism and pharmacokinetics of tamoxifén in normal volunteers. *Cancer Treat Rep* 64: 761-764.
- Ahdieh HB, Brown TJ, Wade GN y Blaustein JD. 1986. Hypothalamic nuclear progesterin receptors and the duration of sexual receptivity in ovariectomized and ovariectomized-hysterectomized rats. *Physiol Behav* 36: 211-215.
- Alarid ET, Bakopoulos N y Solodin N. 1999. Proteasome-mediated proteolysis of estrogen receptor: a novel component in autologous down-regulation. *Mol Endocrinol* 13: 1522-1534.
- Albert DJ, Jonik RH, Gorzalka BB, Newlove T, Webb B y Walsh ML. 1991. Serum estradiol concentration required to maintain body weight, attractivity, proceptivity, and receptivity in the ovariectomized female rat. *Physiol Behav* 49: 225-231.
- Auger AP, Moffatt CA y Blaustein JD. 1997. Progesterone independent activation of rat brain progesterin receptors by reproductive stimuli. *Endocrinology* 138: 511-514.
- Azcoitia I, Yague JG y Garcia-Segura LM. 2011. Estradiol synthesis within the human brain. *Neuroscience* 191: 139-147.
- 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.
- Bai W y Weigel NL. 1995. Phosphorylation and steroid hormone action. *Vitam Horm* 51: 289-313.
- Ballare C, Uhrig M, Bechtold T, Sancho E, Di Domenico M, Migliaccio A, Auricchio F y Beato M. 2003. Two domains of the progesterone receptor interact with the estrogen receptor and are required for progesterone activation of the c-Src/Erk pathway in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 23: 1994-2008.

- Balleine RL, Hunt SM y Clarke CL. 1999. Coexpression of alternatively spliced estrogen and progesterone receptor transcripts in human breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 1370-1377.
- 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.
- Barkhem T, Carlsson B, Nilsson Y, Enmark E, Gustafsson J y Nilsson S. 1998. Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists. *Mol Pharmacol* 54: 105-112.
- Baulieu EE. 1991. On the mechanism of action of RU486. *Ann N Y Acad Sci* 626: 545-560.
- Beach FA. 1942. Importance of progesterone for induction of sexual receptivity in spayed female rats. *Proc Soc Exp Biol* 51: 369-371.
- Beach FA. 1976. Sexual attractiveness, proceptivity, and receptivity in female mammals. *Horm Behav* 7: 105-138.
- Beato M y Sanchez-Pacheco A. 1996. Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocr Rev* 17: 587-609.
- Beebe SJ, Holloway R, Rannels SR y Corbin JD. 1984. Two classes of cAMP analogs which are selective for the two different cAMP-binding sites of type II protein kinase demonstrate synergism when added together to intact adipocytes. *J Biol Chem* 259: 3539-3547.
- Bertram R, Egli M, Toporikova N y Freeman ME. 2006. A mathematical model for the mating-induced prolactin rhythm of female rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E573-E582.
- 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 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, 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, González-Flores O y González-Mariscal G. 1995. Ring A reduced progestins potently stimulate estrous behavior in rats: paradoxical effect through the progesterone receptor. *Physiol Behav* 58: 985-993.

- Beyer C, González-Flores O y González-Mariscal G. 1997. Progesterone receptor participates in the stimulatory effect of LHRH, prostaglandin E2, and cyclic AMP on lordosis and proceptive behaviours in rats. *J Neuroendocrinol* 9: 609-614.
- 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, 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.
- Beyer C, Gomora 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-Mariscal G, Eguíbar JR y Gómora P. 1988. Lordosis facilitation in estrogen primed rats by intrabrain injection of pregnanes. *Pharmacol Biochem Behav.* 31: 919-926.
- Beyer C, Hoffman KL y González-Flores O. 2007. Neuroendocrine regulation of estrous behavior in the rabbit: similarities and differences with the rat. *Horm Behav.* 52: 2-11.
- 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.*
- Bi R, Foy MR, Vouimba RM, Thompson RF y Baudry M. 2001. Cyclic changes in estradiol regulate synaptic plasticity through the MAP kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13391-13395.
- Blaustein JD 1992. Cytoplasmic estrogen receptors in rat brain: immunocytochemical evidence using three antibodies with distinct epitopes. *Endocrinology* 131: 1336-1342.
- 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 treatments that affect lordosis. *Endocrinology* 106: 1061-1069.
- Blaustein JD y Mani SK. 2007. Feminine sexual behavior from neuroendocrine and molecular neurobiological perspectives. En: *handbook of neurochemistry and molecular*

- neurobiology. Behavioral neurochemistry, neuroendocrinology and molecular neurobiology. Lathja A (eds.) Editorial. Springer. New York. pp. 95-149.
- Blaustein JD y Wade GN. 1977. Sequential inhibition of sexual behavior by progesterone in female rats: comparison with a synthetic antiestrogen. *J Comp Physiol Psychol* 91: 752-760.
- Blaustein JD, Dudley SD, Gray JM, Roy EJ y Wade GN. 1979. Long-term retention of estradiol by brain cell nuclei and female rat sexual behavior. *Brain Res* 173: 355-359.
- 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, King JC, Toft DO y Turcotte J. 1988. Immunocytochemical localization of estrogen-induced progestin receptors in guinea pig brain. *Brain Res* 474: 1-15.
- Blaustein JD. 1982. Alteration of sensitivity to progesterone facilitation of lordosis in guinea pigs by modulation of hypothalamic progestin receptors. *Brain Res* 243: 287-300.
- Blaustein JD. 2003. Progestin receptors: neuronal integrators of hormonal and environmental stimulation. *Ann N Y Acad Sci* 1007: 238-250.
- 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.
- Boonyaratanakornkit V, Bi Y, Rudd M y Edwards DP. 2008. The role and mechanism of progesterone receptor activation of extra-nuclear signaling pathways in regulating gene transcription and cell cycle progression. *Steroids* 73: 922-928.
- Boonyaratanakornkit V, Scott M, Ribon V, Sherman L, Anderson S, Maller J, Miller W y Edwards DA. 2001. Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Mol Cell* 8: 269-280.
- Brown TJ y Blaustein JD. 1984. Inhibition of sexual behavior in female guinea pigs by a progestin receptor antagonist. *Brain Res* 301: 343-349.
- Brown TJ, Moore MJ y Blaustein JD. 1987. Maintenance of progesterone-facilitated sexual behavior in female rats requires continued hypothalamic protein synthesis and nuclear progestin receptor occupation. *Endocrinology* 121, 298-304.

- Busch JL, Bridges TM, Richie-Jannetta R, Hollett BP, Francis SH y Corbin JD. 2013. Catalytic site amino acids of PKGI- α influence allosteric cGMP binding. *Front Biosci (Schol Ed)* 5: 650-660.
- Butcher RL, Fugo NW y Collins WE. 1972. Semicircadian rhythm in plasma levels of prolactin during early gestation in the rat. *Endocrinology* 90: 1125-1127.
- Calizo LH y Flanagan-Cato LM. 2002. Estrogen-induced dendritic spine elimination on female rat ventromedial hypothalamic neurons that project to the periaqueductal gray. *J Comp Neurol* 447: 234-248.
- Calizo LH y Flanagan-Cato LM. 2003. Hormonal-neural integration in the female rat ventromedial hypothalamus: triple labeling for estrogen receptor- α , retrograde tract tracing from the periaqueductal gray, and mating-induced Fos expression. *Endocrinology* 144: 5430-5440.
- 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. *J Steroid Biochem Mol Biol* 50: 299-303.
- Cameron NM, Ha GK y Erskine MS. 2004. Fos expression after mating in noradrenergic cells of the A1 and A2 areas of the medulla is altered by adrenalectomy. *J Neuroendocrinol* 16: 750-757.
- Cameron, N y Erskine MS. 2003. c-FOS expression in the forebrain after mating in the female rat is altered by adrenalectomy. *Neuroendocrinology* 77: 305-313.
- Carr WJ y Caul WF. 1962. The effect of castration in rat upon the discrimination of sex odours. *Anim Behav* 10: 20-27.
- Carrillo-Martínez GE, Gómora-Arrati P, González-Arenas A, Roldán-Roldán G, González-Flores O y Camacho-Arroyo I. 2011. Effects of RU486 in the expression of progesterone receptor isoforms in the hypothalamus and the preoptic area of the rat during postpartum estrus. *Neurosci Lett* 504: 127-130.
- Ceccatelli S, Grandison L, Scott RE, Pfaff DW y Kow LM. 1996. Estradiol regulation of nitric oxide synthase mRNAs in rat hypothalamus. *Neuroendocrinology*. 64, 357-63.
- Cenni B y Picard D. 1999. Ligand-independent activation of steroid receptors: new roles for old players. *Trends Endocrinol Metab* 10: 41-46.

- Charpantier E, Wiesner A, Huh KH, Ogier R, Hoda JC, Allaman G, Raggenbass M, Feuerbach D, Bertrand D y Fuhrer C. 2005. Alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptors are negatively regulated by tyrosine phosphorylation and Src-family kinases. *J Neurosci* 25: 9836-9849.
- Chauchereau A, Cohen-Solal K, Jolivet A, Bailly A y Milgrom E. 1994. Phosphorylation sites in ligand-induced and ligand-independent activation of the progesterone receptor. *Biochemistry* 33: 13295-13303.
- Chazal G, Faudon M, Gogan F y Rotsztein W. 1975. Effects of two estradiol antagonists upon the estradiol uptake in the rat brain and peripheral tissues. *Brain Res* 89: 245-254.
- Chen C, Kuo J, Wong A y Micevych P. 2014. Estradiol modulates translocator protein (TSPO) and steroid acute regulatory protein (StAR) via protein kinase A (PKA) signaling in hypothalamic astrocytes. *Endocrinology* 155: 2976-2985
- Chen J, An BS, Cheng L, Hammond GL y Leung PC. 2009. Gonadotropin-releasing hormone-mediated phosphorylation of estrogen receptor-alpha contributes to fosB expression in mouse gonadotrophs. *Endocrinology* 150: 4583-4593.
- Chen J, An BS, So WK, Cheng L, Hammond GL y Leung PC. 2010. Gonadotropin-releasing hormone-I-mediated activation of progesterone receptor contributes to gonadotropin alpha-subunit expression in mouse gonadotrophs. *Endocrinology* 151: 1204-1211.
- Cheng KW y Leung P. 2000. The expression, regulation and signal transduction pathways of the mammalian gonadotropin-releasing hormone receptor. *Can J Physiol Pharmacol* 78: 1029-1050.
- Chinapen S, Swann JM, Steinman JL y Komisaruk BR. 1992. Expression of c-fos protein in lumbosacral spinal cord in response to vaginocervical stimulation in rats. *Neurosci Lett* 145: 93-96.
- Choi UB, Xiao S, Wollmuth LP y Bowen ME. 2011. Effect of Src kinase phosphorylation on disordered C-terminal domain of N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor subunit GluN2B protein. *J Biol Chem* 286: 29904-29912.
- Chu HP y Etgen AM. 1997. A potential role of cyclic GMP in the regulation of lordosis behavior of female rats. *Horm Behav* 32: 125-132.
- Chu HP, Morales JC y Etgen AM. 1999. Cyclic GMP may potentiate lordosis behaviour by progesterone receptor activation. *J Neuroendocrinol* 11: 107-113.

- 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 DW y Goy RW (eds.) Editorial. Plenum Press. New York and London. pp. 1833-1858.
- Compston JE. 2001. Sex steroids and bone. *Physiol Rev* 81: 419-447.
- 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.
- 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.
- Coolen LM, Peters HJ y Veening JG. 1996. Fos immunoreactivity in the rat brain following consummatory elements of sexual behavior: a sex comparison. *Brain Res* 738: 67-82.
- Coria-Ávila GA y Pfaus JG. 2007. Neuronal activation by stimuli that predict sexual reward in female rats. *Neuroscience* 148: 623-632.
- Corodimas KP y Morrell JI. 1990. Estradiol-concentrating forebrain and midbrain neurons project directly to the medulla. *J Comp Neurol* 291: 609-620.
- Cui J, Shen Y y Li R. 2013. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends Mol Med* 19: 197-209.
- Czaja JA, Goldfoot DA y Karavolas HJ. 1974. Comparative facilitation and inhibition of lordosis in the guinea pig with progesterone, 5-alpha-pregnane-3,2-dione, or 3-alpha-hydroxy-5-alpha-pregnan-20-one. *Horm Behav* 5: 261-274.
- Da Vies P, Syne JS y Nicholson RI. 1979. Effects of estradiol and the antiestrogen tamoxifén on steroid hormone receptor concentration and nuclear ribonucleic acid polymerase activities in rat uteri. *Endocrinology* 105: 1336-1342.
- Davidson JM, Rodgers CH, Smith ER y Bloch GJ. 1968. Stimulation of female sex behavior in adrenalectomized rats with estrogen alone. *Endocrinology* 82: 193-195.
- De Greef WJ y Neill JD. 1979. Dopamine levels in hypophysial stalk plasma of the rat during surges of prolactin secretion induced by cervical stimulation. *Endocrinology* 105: 1093-1099.
- Debold JF y Frye CA. 1994. Genomic and non-genomic actions of progesterone in the control of female hamster sexual behavior. *Horm Behav* 28: 445-453.

- DeBold JF y Malsbury CW. 1989. Facilitation of sexual receptivity by hypothalamic and midbrain implants of progesterone in female hamsters. *Physiol Behav* 46: 655-660.
- DeMarzo AM, Oñate SA, Nordeen SK y Edwards DP. 1992. Effects of the steroid antagonist RU486 on dimerization of the human progesterone receptor. *Biochemistry* 31: 10491-10501.
- 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.
- Domínguez-Ordóñez R, García-Juárez M, Lima-Hernández FJ, Gómora-Arrati P, Blaustein JD y González-Flores O. 2015. Sexual receptivity facilitated by unesterified estradiol: dependence on estrogen and progestin receptors and priming dose of estradiol benzoate. *Behav Neurosc* 129: 777-788.
- Domínguez-Ordóñez R, García-Juárez M, Lima-Hernández FJ, Gómora-Arrati P, Blaustein JD, Etgen AM y González-Flores O. 2016. Estrogen receptor α and β are involved in estradiol-primed rats. *Horm Behav* 86: 1-7.
- Doty RL y Dunbar I. 1974. Attraction of beagles to conspecific urine, vaginal and anal sac secretion odours. *Physiol Behav* 12: 825-833
- Eaton GG, Goy RW y Resko JA. 1975. Brain uptake and metabolism of estradiol benzoate and estrous behavior in ovariectomized guinea pigs. *Horm Behav* 6: 81-97.
- Edwards DP, 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, Whalen RE y Nadler RD. 1968. Induction of estrus: estrogen-progesterone interactions. *Physiol Behav* 3: 29-33.
- 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.
- Ellmann S, Sticht H, Thiel F, Beckmann MW, Strick R y Strissel PL. 2009. Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. *Cell Mol Life Sci* 66: 2405-2426.

- Endoh T. 2005. Involvement of Src tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase in the facilitation of calcium channels in rat nucleus of the tractus solitarius by angiotensin II. *J Physiol* 568: 851-865.
- Erickson GF y Hsueh AJ. 1978. Secretion of "inhibin" by rat granulosa cells in vitro. *Endocrinology* 103: 1960-1963.
- Erskine MS. 1989. Solicitation behavior in the estrous female rat: a review. *Horm Behav* 23: 473-502.
- Erskine MS. 1993. Mating-induced increases in FOS protein in preoptic area and medial amygdala of cycling female rats. *Brain Res Bull* 32: 447-451.
- Etgen AM y Acosta-Martínez M. 2003. Participation of growth factor signal transduction pathways in estradiol facilitation of female reproductive behavior. *Endocrinology* 144: 3828-3835.
- Etgen AM y Barfield RJ. 1986. Antagonism of female sexual behavior with intracerebral implants of antiprogestin RU 38486: correlation with binding to neural progestin receptors. *Endocrinology* 119: 1610-1617.
- Etgen AM y Shamamian P. 1986. Regulation of estrogen-stimulated lordosis behavior and hypothalamic progestin receptor induction by antiestrogens in female rats. *Horm Behav* 20: 166-180.
- Etgen AM, González-Flores O y Todd BJ. 2006. The role of insulin-like growth factor-I and growth factor-associated signal transduction pathways in estradiol and progesterone facilitation of female reproductive behaviors. *Front Neuroendocrinol* 27: 363-375.
- Etgen AM. 1979. Antiestrogens: effects of tamoxifén, nafoxidine, and CI-628 on sexual behavior, cytoplasmic receptors, and nuclear binding of estrogen. *Horm Behav* 13: 97-112.
- Etgen AM. 1984. Progestin receptors and the activation of female reproductive behavior: a critical review. *Horm Behav* 18: 411-430.
- Etgen AM. 2003. Ovarian steroid and growth factor regulation of female reproductive function involves modification of hypothalamic alpha 1-adrenoceptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* 1007: 153-161.
- Fadem BH, Barfield RJ y Whalen RE. 1979. Dose-response and time-response relationships between progesterone and the display of patterns of receptive and proceptive behavior in the female rat. *Horm Behav* 13: 40-48.

- Faivre E, Skildum A, Pierson-Mullany L y Lange CA. 2005. Integration of progesterone receptor mediated rapid signaling and nuclear actions in breast cancer cell models: role of mitogen-activated protein kinases and cell cycle regulators. *Steroids* 70: 418-426.
- Farooq A y Zhou MM. 2004. Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal* 16: 769-779.
- Feder HH y Silver R. 1974. Activation of lordosis in ovariectomized guinea pigs by free and esterified forms of estrone, estradiol-17 beta and estriol. *Physiol Behav* 13: 251-255.
- Feder HR y Morin LP. 1974. Suppression of lordosis in guinea pigs by ethamoxy-triphetol (MER-25) given at long intervals (34-46 hr) after estradiol benzoate treatment. *Horm Behav* 5: 63-71.
- 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, Rodríguez-Manzo G y Beyer C. 1983. Effect of guanine derivatives on lordosis behavior in estrogen primed rats. *Physiol Behav* 31: 589-592.
- Flanagan LM, Pfaus JG, Pfaff DW y McEwen BS. 1993. Induction of FOS immunoreactivity in oxytocin neurons after sexual activity in female rats. *Neuroendocrinology* 58: 352-358.
- Flanagan-Cato LM, Lee BJ y Calizo LH. 2006. Co-localization of midbrain projections, progestin receptors, and mating-induced fos in the hypothalamic ventromedial nucleus of the female rat. *Horm Behav* 50: 52-60.
- Francis SH y Corbin JD. 1999. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action. *Crit Rev Clin Lab Sci* 36: 275-328.
- Francis SH, Busch JL, Corbin JD y Sibley D. 2010. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev* 62: 525-563.
- Freeman M. 2005. The neuroendocrine control of ovarian cycle of the rat. En: Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*. Neil J (eds.) Editorial. Raven Press. New York. pp. 2327-2388.
- Freeman ME y Neill JD. 1972. The pattern of prolactin secretion during pseudopregnancy in the rat: a daily nocturnal surge. *Endocrinology* 90: 1292-1294.
- Freeman ME, Smith MS, Nazian SJ y Neill JD. 1972. Ovarian and hypothalamic control of the daily surges of prolactin secretion during pseudopregnancy in the rat. *Endocrinology* 94: 875-882.

- 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.
- García-Juárez M, Beyer C, Gómora-Arrati P, Domínguez-Ordóñez R, Lima-Hernández FJ, Eguibar JR, Galicia-Aguas YL, Etgen AM y González-Flores O. 2013. Lordosis facilitation by leptin in ovariectomized, estrogen-primed rats requires simultaneous or sequential activation of several protein kinase pathways. *Pharmacol Biochem Behav* 110: 13-18.
- García-Juárez M, Beyer C, Gómora-Arrati P, Lima-Hernández FJ, Domínguez-Ordóñez R, Eguibar JR, Etgen AM y González-Flores O. 2012. The nitric oxide pathway participates in lordosis behavior induced by central administration of leptin. *Neuropeptides* 46: 49-53.
- García-Juárez M, Beyer C, Soto-Sánchez A, Domínguez-Ordóñez R, Gómora-Arrati P, Lima-Hernández FJ, Eguibar JR, Etgen AM y González-Flores O. 2011. Leptin facilitates lordosis behavior through GnRH-1 and progestin receptors in estrogen-primed rats. *Neuropeptides* 45: 63-67.
- García-Segura LM, Hernández P, Olmos G, Tranque PA y Naftolin F. 1988. Neuronal membrane remodelling during the oestrus cycle: a freeze-fracture study in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. *J Neurocytol* 17: 377-383.
- Gatson JW, Simpkins JW, Yi KD, Idris AH, Minei JP y Wigginton JG. 2011. Aromatase is increased in astrocytes in the presence of elevated pressure. *Endocrinology* 152: 207-213.
- Gee JM, Willsher PC, Kenny FS, Robertson JF, Pinder SE, Ellis IO y Nicholson RI. 1999. Endocrine response and resistance in breast cancer: a role for the transcription factor Fos. *Int J Cancer* 84: 54-61.
- Gerrits PO, Krukerink M y Veening JG. 2009. Columnar organization of estrogen receptor-alpha immunoreactive neurons in the periaqueductal gray projecting to the nucleus pararetroambiguus in the caudal brainstem of the female golden hamster. *Neuroscience* 161: 459-474.
- Ghanima A, Bennis M, Rampin O y Rousseau JP. 2000. Influence of estrous cycle on vaginocervical sensitivity: a fos-immunohistochemical study of lumbosacral spinal cord. *Brain Res* 880: 109-117.

- 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.
- González-Arenas A, Peña-Ortiz MÁ, Hansberg-Pastor V, Marquina-Sánchez B, Baranda-Ávila N, Nava-Castro K, Cabrera-Wrooman A, González-Jorge J y Camacho-Arroyo I. 2015. PKC α and PKC δ activation regulates transcriptional activity and degradation of progesterone receptor in human astrocytoma cells. *Endocrinology* 156: 1010-1022.
- González-Flores O y Etgen AM. 2004. The nitric oxide pathway participates in estrous behavior induced by progesterone and some of its ring A-reduced metabolites. *Horm Behav* 45: 50-57.
- González-Flores O, Beyer C, Gómora-Arrati P, García-Juárez M, Lima-Hernández FJ, Soto-Sánchez A y Etgen AM. 2010. A role for Src kinase in progestin facilitation of estrous behavior in estradiol-primed female rats. *Horm Behav* 58: 223-229.
- González-Flores O, Etgen AM, Komisaruk BK, Gómora-Arrati P, Macias-Jimenez A, Lima-Hernández FJ, Garcia-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, Shu J, Camacho-Arroyo I y Etgen AM. 2004b. Regulation of lordosis by cyclic 3',5'-guanosine monophosphate, progesterone, and its 5 α -reduced metabolites involves mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 145: 5560-5567.
- González-Flores O, Gómora-Arrati P, Garcia-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, Guerra-Araiza C, Cerbón M, Camacho-Arroyo I y Etgen AM. 2004c. The 26S proteasome participates in the sequential inhibition of estrous behavior induced by progesterone in rats. *Endocrinology*. 145: 2328-2336.

- González-Flores O, Ramírez-Orduña JM, Lima-Hernández FJ, García-Juárez M y Beyer C. 2006. Differential effect of kinase A and C blockers on lordosis facilitation by progesterone and its metabolites in ovariectomized estrogen-primed rats. *Horm Behav* 49: 398-404.
- González-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 y Beyer C. 1993. Progesterone, but not LHRH or prostaglandin E₂, induces sequential inhibition of lordosis to various lordogenic agents. *Neuroendocrinology* 57: 940-945.
- Gottfried-Blackmore A, Sierra A, Jellinck PH, McEwen BS y Bulloch K. 2008. Brain microglia express steroid-converting enzymes in the mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109: 96-107.
- Gréco 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.
- Green R, Luttge WG y Whalen RE. 1970. Induction of receptivity in ovariectomized female rats by a single intravenous injection of estradiol-17. *Physiol Behav* 5: 137-141.
- Groveman BR, Feng S, Fang XQ, Pflueger M, Lin SX, Bienkiewicz EA y Yu X. 2012. The regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by Src kinase. *FEBS J* 279: 20-28.
- 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.
- Guerra-Araiza C, Villamar-Cruz O, González-Arenas A, Chavira R y Camacho-Arroyo I. 2003. Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after oestradiol and progesterone treatments. *J Neuroendocrinol* 15: 984-990.
- Guevara-Guzmán R, Buzo E, Larrazolo A, de la Riva C, Da Costa AP y Kendrick KM. 2001. Vagino-cervical stimulation-induced release of classical neurotransmitters and nitric oxide

- in the nucleus of the solitary tract varies as a function of the oestrus cycle. *Brain Res* 898: 303-313.
- Hagan CR, Faivre EJ y Lange CA. 2009. Scaffolding actions of membrane-associated progesterone receptors. *Steroids* 74: 568-572.
- Han KK y Martinage A. 1992. Post-translational chemical modification(s) of proteins. *Int J Biochem* 24: 19-28.
- Hardy DF y DeBold JF. 1972. Effects of coital stimulation upon behavior of the female rat. *J Comp Physiol Psychol* 78: 400-408.
- Harper MJ y Walpole AL. 1967. A new derivative of triphenylethylene: effect on implantation and mode of action in rats. *J Reprod Fertil* 13: 101-119.
- Hasan TN, Leena GB, Masoodi TA, Shafi G, Alshatwi AA y Sivashanmugham P. 2011. Affinity of estrogens for human progesterone receptor A and B monomers and risk of breast cancer: A comparative molecular modeling study. *Adv Appl Bioinf Chem* 4: 29-36.
- Hedden A, Müller V y Jensen EV. 1995. A new interpretation of antiestrogen action. *Ann N Y Acad Sci*. 761: 109-120.
- Herbison AE y Pape JR. 2001. New evidence for estrogen receptors in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Front Neuroendocrinol* 22: 292-308.
- 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.
- Hillier SG, Yong EL, Illingworth PJ, Baird DT, Schwall RH y Mason AJ. 1991. Effect of recombinant inhibin on androgen synthesis in cultured human thecal cells. *Mol Cell Endocrinol* 75: R1-6.
- Hillier SG, Whitelaw PF y Smyth CD. 1994. Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. *Mol Cell Endocrinol* 100: 51-54.
- 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.
- Ho AK, Hashimoto K y Chik CL. 1999. 3'5'-Cyclic guanosine monophosphate activates mitogen-activated protein kinase in rat pinealocytes. *J Neurochem* 73: 598-604.

- Horwitz KB y Alexander PS. 1983. In situ photolinked nuclear progesterone receptors 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 SB, Etgen AM y Barfield RJ. 1984. Antagonism of central estrogen action by intracerebral implants of tamoxifén. *Horm Behav* 18: 256-266.
- Hubscher CH y Berkley KJ. 1994. Responses of neurons in caudal solitary nucleus of female rats to stimulation of vagina, cervix, uterine horn and colon. *Brain Res* 664: 1-8.
- Hunter T y Sefton BM. 1980. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 1311-1315.
- Hunter T. 2000. Signaling 2000 and beyond. *Cell* 100: 113-127.
- Ichikawa S, Sawada T, Nakamura Y y Morioka H. 1974. Ovarian secretion of pregnane compounds during the estrous cycle and pregnancy in rats. *Endocrinology* 94: 1615-1620.
- 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.
- Järvinen TA, Pelto-Huikko M, Holli K e Isola J. 2000. Estrogen receptor beta is coexpressed with ERalpha and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation rate in breast cancer. *Am J Pathol* 156: 29-35.
- Jensen EV, Suzuki T, Kawashima T, Stumpf WE, Jungblut PW y DeSombre ER.. 1968. A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 59: 632-638.
- Johnson GL y Lapadat R. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298: 1911-1912.
- Jones SL y Pfau JG. 2014. Sensitization of sexual behaviors in ovariectomized Long-Evans rats is induced by a subthreshold dose of estradiol benzoate and attenuated by repeated copulation. *Horm Behav* 66: 655-662.
- Jones SL, Farrell S, Gregory JG y Pfau JG. 2013. Sensitization of sexual behavior in ovariectomized rats by chronic estradiol treatment. *Horm Behav* 64: 8-18.

- Jordan VC, Dix CJ, Rowsby L y Prestwich G. 1977. Studies on the mechanism of action of the nonsteroidal antioestrogen tamoxifén (I. C. I. 46,474) in the rat. *Mol Cell Endocrinol* 7: 177-192.
- 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.
- 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. 1977. Specific progesterone receptors in the hypothalamus and anterior hypophysis of the rat. *Endocrinology* 101: 920-928.
- 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.
- Katzenellenbogen BS, Ferguson ER y Lan NC. 1977. Fundamental differences in the action of estrogens and antiestrogens on the uterus: comparison between compounds with similar duration of action. *Endocrinology* 100: 1252-1259.
- Kimura F, Kawakami MHN y McCann SM. 1980. Changes in adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate concentrations in the anterior pituitary and hypothalamus during the rat estrous cycle and effects of administration of sodium pentobarbital in proestrus. *Endocrinology* 106: 631-635.
- Komalavias P, Shah PK, HJ y Lincoln TM. 1999. Activation of mitogen-activated protein kinase pathways by GMP and GMP-dependet protein kinase in contractile vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 274: 34301-34309.
- 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.
- Komisaruk BR, Adler NT y Hutchison J. 1972. Genital sensory field: enlargement by estrogen treatment in female rats. *Science* 178: 1295-1298.
- Koseki Y, Zava DT, Chamness GC y McGuire WL. 1977. Estrogen receptor translocation and replenishment by the antiestrogen tamoxifén. *Endocrinology* 101: 1104-1110.

- Kotov A, Falany JL, Wang J y Falany CN. 1999. Regulation of estrogen activity by sulfation in human Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 68: 137-144.
- Kow LM y Pfaff DW. 1975. Induction of lordosis in female rats: Two modes of estrogen action and the effect of adrenalectomy. *Horm Behav* 6: 259-276.
- Kow LM y Pfaff DW. 1979. Responses of single units in sixth lumbar dorsal root ganglion of female rats to mechanostimulation relevant for lordosis reflex. *J Neurophysiol* 42: 203-213.
- Kow LM y Pfaff DW. 2004. The membrane actions of estrogens can potentiate their lordosis behavior-facilitating genomic actions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 12354-12357.
- Kow LM, Mobbs CV y Pfaff DW. 1994. Roles of second messenger systems and neuronal activity in the regulation of lordosis by neurotransmitters, neuropeptides and estrogen: a review. *Neurosci Biochem Rev* 18: 251-268.
- Kow LM, Montgomery MO y Pfaff DW. 1977. Effects of spinal cord transections on lordosis reflex in female rats. *Brain Res* 123: 75-88.
- Kubli-Garfias C y Whalen RE. 1977. Induction of lordosis behavior in female rats by intravenous administration of progestins. *Horm Behav* 9: 380-6.
- Kudwa AE y Rissman EF. 2003. Double oestrogen receptor alpha and beta knockout mice reveal differences in neural oestrogen-mediated progestin receptor induction and female sexual behaviour. *J Neuroendocrinol* 15: 978-983.
- Kuhl H. 1990. Pharmacokinetics of oestrogens and progestogens. *Maturitas* 12: 171-197.
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S y Gustafsson JA. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5925-5930.
- Kuo JF y Greengard P. 1969. An adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 244: 3417-3419.
- Kurl RN y Morris ID. 1978. Differential depletion of cytoplasmic high affinity oestrogen receptors after the in vivo administration of the antioestrogens, clomiphene, MER-25 and tamoxifen. *Brit J Pharm* 62: 487-493.
- 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.
- Landau IT. 1977. Relationships between the effects of the anti-estrogen, CI-628, on sexual behavior, uterine growth, and cell nuclear estrogen retention after estradiol-17beta-benzoate administration in the ovariectomized rat. *Brain Res* 133: 119-138.
- Lange CA, Richer T, Shen T y Horwitz KB. 1998. Convergence of progesterone and epidermal growth factor signaling in breast cancer. Potentiation of mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 273: 31303-31316.
- Lange CA, Shen T y Horwitz KB. 2000. Phosphorylation of human progesterone receptor at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1032-1037.
- 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.
- 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: 269-78.
- Lange CA. 2008. Integration of progesterone receptor action with rapid signaling events in breast cancer models. *J Steroid Biochem Mol Biol* 108: 203-12.
- 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.
- Lauber AH, Mobbs CV, Muramatsu M y Pfaff DW. 1991. Estrogen receptor messenger RNA expression in rat hypothalamus as a function of genetic sex and estrogen dose. *Endocrinology* 129: 3180-3186.
- Lee JW y Erskine MS. 1996. Vagino-cervical stimulation suppresses the expression of c-fos induced by mating in thoracic, lumbar and sacral segments of the female rat. *Neuroscience* 74: 237-249.
- Lima-Hernández FJ, Beyer C, Gómora-Arrati P, García-Juárez M, Encarnación-Sánchez JL, Etgen AM y González-Flores O. 2012. Src kinase signaling mediates estrous behavior induced by 5beta-reduced progestins, GnRH, prostaglandin E2 and vagino-cervical stimulation in estrogen-primed rats. *Horm Behav* 62: 579-584.

- Lima-Hernández FJ, Gómora-Arrati P, García-Juárez M, Blaustein JD, Etgen AM, Beyer C y González-Flores O .2014. Estrogen receptors regulate the estrous behavior induced by progestins, peptides, and prostaglandin E2. *Horm Behav*: 66: 361-368.
- Lisk RD. 1962. Diencephalic placement of estradiol and sexual receptivity in the female rat. *Am J Physiol* 203: 493-496.
- Lloyd AC. 2006. Distinct functions for ERKs?. *J Biol* 5: 13.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky L, Darnell J. 2005. *Molecular Cell Biology*. Molecular cell biology. Editorial. W.H. Freeman and Company. New York.
- Loose DS y Stancel GM. 2007. Estrogens and progestagens. En: Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. Brunton LL, Lazo JS y Parker KL (eds.) Editorial. McGraw Hill Interamericana. Columbia. pp. 1541-1572.
- Loyd DR y Murphy AZ. 2006. Sex differences in the anatomical and functional organization of the periaqueductal gray-rostral ventromedial medullary pathway in the rat: a potential circuit mediating the sexually dimorphic actions of morphine. *J Comp Neurol* 496: 723-738.
- Loyd DR y Murphy AZ. 2008. Androgen and estrogen (alpha) receptor localization on periaqueductal gray neurons projecting to the rostral ventromedial medulla in the male and female rat. *J Chem Neuroanat* 36: 216-226.
- Lucas PD, Donohoe SM y Thody AJ. 1982. The role of estrogen and progesterone in the control of preputial gland sex attractant odors in the female rat. *Physiol Behav* 28: 601-607.
- Luine VN. 1985. Estradiol increases choline acetyltransferase activity in specific basal forebrain nuclei and projection areas of female rats. *Exp Neurol* 89: 484-490.
- Lydell K y Doty RL. 1972. Male rat odor preferences for female urine as a function of sexual experience, urine age and urine source. *Horm Behav* 3: 205-212
- MacLusky NJ y McEwen BS. 1978. Oestrogen modulates progestin receptor concentrations in some rat brain regions but not in others. *Nature* 274: 276-278.
- MacLusky NJ y McEwen BS. 1980. Progestin receptors in rat brain: distribution and properties of cytoplasmic progestin-binding sites. *Endocrinology* 106: 192-202.
- Malsbury CW, Kow LM y Pfaff DW. 1977. Effects of medial hypothalamic lesions on the lordosis response and other behaviors in remale 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.
- Mani SK y Blaustein JD. 2012. Neural progesterin receptors and female sexual behavior. *Neuroendocrinology* 96: 152-161.
- Mani SK y Portillo W. 2010. Activation of progesterin 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. 1994. Convergent pathways for steroid hormone- and neurotransmitter-induced rat sexual behavior. *Science* 265: 1246-1249.
- Mani SK, Allen JM, Rettori V, McCann SM, O'Malley BW y Clark JH. (1994a). Nitric oxide mediates sexual behavior in female rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6468-6472.
- Mani SK, Allen JM, Lydon JP, Mulac-Jericevic B, Blaustein JD, DeMayo FJ, Conneely O y O'Malley BW. 1996. Dopamine requires the unoccupied progesterone receptor to induce sexual behavior in mice. *Mol Endocrinol* 10: 1728-1737.
- Mani SK, Blaustein JD, Allen JM, Law SW, O'Malley BW y Clark JH. 1994. Inhibition of rat sexual behavior by antisense oligonucleotides to the progesterone receptor. *Endocrinology* 135: 1409-1414.
- Mani SK, Fienberg AA, O'Callaghan JP, Snyder GL, Allen PB, Dash PK, Moore AN, Mitchell AJ, Bibb J, Greengard P y O'Malley BW. 2000. Requirement for DARPP-32 in progesterone-facilitated sexual receptivity in female rats and mice. *Science* 287: 1053-1056.
- Mani, SK y O'malley B.W. 2009. Mechanisms of action of progesterone and DA on female reproductive behavior. En: *Molecular Mechanisms of Hormone Actions on Behavior*, Pfaff DW y Etgen AM (eds.) Editorial. Elsevier. London. pp. 391-395.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T y Sudarsanam S. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298: 1912-1934.
- Martin GS. 2001. The hunting of the Src. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 467-475.
- McCann SM, Mastronardi C, Walczewska A, Karanth S, Rettori V y Yu WH. (1999). The role of nitric oxide in reproduction. *Braz J Med Biol Res* 32: 1367-1379.

- McDonnell DP. 1995. Unraveling the human progesterone receptor signal transduction pathway
Insights into antiprogestin action. *Trends Endocrinol Metab* 6: 133-138.
- McEwen BS y Alves SE. 1999. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev* 20:
279-307.
- 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.
- McEwen BS, Pfaff DW, Chaptal C y Luine VN. 1975. Brain cell nuclear retention of [³H]estradiol
doses able to promote lordosis: Temporal and regional aspects. *Brain Research* 86: 155-
161.
- McEwen BS, Pfaff DW, Chaptal C y Luine VN. 1975. Brain cell nuclear retention of [³H]estradiol
doses able to promote lordosis: temporal and regional aspects. *Brain Res* 86: 155-161.
- McGinnis M, 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 M, 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.
- McInerney EM y Katzenellenbogen BS. 1996. Different regions in activation function-1 of the
human estrogen receptor required for antiestrogen- and estradiol-dependent transcription
activation. *J Biol Chem* 271: 24172-24178.
- McKee DT, Poletini MO, Bertram R, Freeman ME. 2007. Oxytocin action at the lactotroph is
required for prolactin surges in cervically stimulated ovariectomized rats. *Endocrinology*
148: 4649-4657.
- McKenna SE, Simon NG y Cologer-Clifford A. 1992. An assessment of agonist/antagonist effects
of tamoxifén in the female mouse brain. *Horm Behav* 26: 536-544.
- 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.
- Meisel RL, Dohanich GP, McEwen BS y Pfaff DW. 1987. Antagonism of sexual behavior in
female rats by ventromedial hypothalamic implants of antiestrogen. *Neuroendocrinology*:
45: 201-207.

- Merchenthaler I, Lane MV, Numan S y Dellovade TL. 2004. Distribution of estrogen receptor alpha and beta in the mouse central nervous system: in vivo autoradiographic and immunocytochemical analyses. *J Comp Neurol* 473: 270-291.
- 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.
- Micevych P, Kuo J y Christensen A. 2009. Physiology of membrane oestrogen receptor signalling in reproduction. *J Neuroendocrinol* 21: 249-256.
- Micevych P, Soma KK y Sinchak K. 2008. Neuroprogesterone: Key to estrogen positive feedback?. *Brain Res Rev* 57: 470-480.
- Micevych PE y Dewing P. 2011. Membrane-initiated estradiol signaling regulating sexual receptivity. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2: 26.
- Micevych PE y Kelly MJ. 2012. Membrane estrogen receptor regulation of hypothalamic function. *Neuroendocrinology* 96: 103-110.
- Micevych PE y Sinchak K. 2013. Temporal and concentration-dependent effects of oestradiol on neural pathways mediating sexual receptivity. *J Neuroendocrinol* 25: 1012–1023.
- Micevych PE, Wong AM y Mittelman-Smith MA. (2015). Estradiol membrane-initiated signaling and female reproduction. *Compr Physiol* 5: 1211-1222.
- Migliaccio A, Castoria G y Auricchio F. 2007. Src-dependent signalling pathway regulation by sex-steroid hormones: therapeutic implications. *Int J Biochem Cell Biol* 39:1343–1348.
- Migliaccio A, Piccolo D, Castoria G, Di Domenico M, Bilancio A, Lombardi M, Gong W, Beato M y Auricchio F. 1998. Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J* 17: 2008-2018.
- Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, de Falco A, Bontempo P, Nola E y Auricchio F. 1996. Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J*. 15, 1292-1300.
- 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.
- Mobbs BG y Liu Y. 1990. Immunohistochemical localization of progesterone receptor in benign and malignant human prostate. *Prostate* 16: 245-251.

- Mobbs CV, Rothfeld JM, Saluja R y Pfaff DW. 1989. Phorbol esters and forskolin infused into midbrain central gray facilitate lordosis. *Pharmacol Biochem Behav* 34: 665-667.
- 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.
- 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 Physiol Psychol* 89: 231-237.
- 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. 1979. The relevance of hypothalamic and hypophysial progesterin receptor regulation in the induction and inhibition of sexual behavior in the female rat. *Endocrinology* 105: 516-22.
- Monken CE y Gill GN. 1980. Structural analysis of cGMP-dependent protein kinase using limited proteolysis. *J Biol Chem* 255: 7067-7070.
- 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.
- Moreines JK y Powers JB. 1977. Effects of acute ovariectomy on the lordosis response of female rats. *Physiol Behav* 19: 277-283.
- 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: 343-54.
- Moss RL. 1971. Modification of copulatory behavior in the female rat following olfactory bulb removal. *J Comp Physiol Psychol* 74: 374-38
- Moss RL. 1971. Modification of copulatory behavior in the female rat following olfactory bulb removal. *J Comp Physiol Psychol* 74: 374-382.
- 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.
- 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.
- Nance DM, Shryne J y Gorski RA. 1974. Septal lesions: effects on lordosis behavior and pattern of gonadotropin release. *Horm Behav* 5: 73-81.
- Nestler EJ y Duman RS. 1994. G proteins and cyclic nucleotides in the nervous system. En: *Basic Neurochemistry*. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW y Molinoff PB (eds.) Editorial. Raven Press. New York. pp. 429-448.
- Nestler EJ y Greengard P. 1999. Serine and threonine phosphorylation. En: *Basic Neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK y Uhler MD (eds.) Editorial. Lippincott, Williams and Wilkins. New York. pp. 471-495.
- Nirmala PB y Thampan RV. 1995. Ubiquitination of the rat uterine estrogen receptor: dependence on estradiol. *Biochem Biophys Res Commun* 213: 24-31.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Norman AW, Mizwicki MT y Norman DP. 2004. Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nat Rev Drug Discov* 3: 27-41.
- Normandin JJ y Murphy AZ. 2011a. Excitotoxic lesions of the nucleus paragigantocellularis facilitate male sexual behavior but attenuate female sexual behavior in rats. *Neuroscience* 175: 212-223.
- Normandin JJ y Murphy AZ. 2011b. Serotonergic lesions of the periaqueductal gray, a primary source of serotonin to the nucleus paragigantocellularis, facilitate sexual behavior in male rats. *Pharmacol Biochem Behav* 98: 369-375.
- Norris JD, Fan D, Kerner SA y McDonnell DP. 1997. Identification of a third autonomous activation domain within the human estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 11: 747-754.
- Ogawa S, Eng V, Taylor J, Lubahn DB, Korach KS y Pfaff DW. 1998. Roles of estrogen receptor-alpha gene expression in reproduction-related behaviors in female mice. *Endocrinology* 139: 5070-5081.

- Ohnishi H, Murata Y, Okazawa H y Matozaki T. 2011. Src family kinases: modulators of neurotransmitter receptor function and behavior. *Trends Neurosci* 34: 629-637.
- O'Malley BW, Tsai SY, Bagchi M, Weigel NL, Schrader WT y Tsai MJ. 1991. Molecular mechanism of action of a steroid hormone receptor. *Recent Prog Horm Res.* 47: 1-24.
- Oñate 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.
- Orsulak, P. J. and A. M. Gawienowski. 1972. Olfactory preferences for the rat preputial gland. *Biol Reprod* 6: 219-223.
- Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ y Scanlan TS. 1997. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* 277: 1508-1510.
- Palmon SC, Williams MJ, Littleton-Kearney MT, Traystman RJ, Kosk-Kosicka D y Hurn PD. 1998. Estrogen increases cGMP in selected brain regions and in cerebral microvessels. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:1248-1252.
- Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, Knudsen TB, Lacapere JJ, Lindemann P, Norenberg MD, Nutt D, Weizman A, Zhang MR y Gavish M. 2006. Translocator protein (18 kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci* 27: 402-409.
- Parada M, Chamas L, Censi S, Coria-Avila G y Pfaus JG. 2010. Clitoral stimulation induces conditioned place preference and Fos activation in the rat. *Horm Behav* 57: 112-118.
- Paredes-Ramos P, Pfaus JG, Miquel M, Manzo J y Coria-Avila GA. 2011. Sexual reward induces Fos in the cerebellum of female rats. *Physiol Behav* 102: 143-148.
- Parsons B, MacLusky NJ, Krey L, Pfaff DW y McEwen BS. 1980. The temporal relationship between estrogen-inducible progesterin receptors in the female rat brain and the time course of estrogen activation of mating behavior. *Endocrinology* 107: 774-779.
- Parsons B, Rainbow TC, Snyder L y McEwen BS. 1984. Progesterone-like effects of estradiol on reproductive behavior and hypothalamic progesterin receptors in the female rat. *Neuroendocrinology*: 39: 25-30.
- 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.
- Peltoketo H, Nokelainen P, Piao YS, Vihko R y Vihko P. 1999. Two 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases (17HSDs) of estradiol biosynthesis: 17HSD type 1 and type 7. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69: 431-439.
- 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 y Keiner M. 1973. Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat. *J Comp Neurol* 151: 121-158.
- Pfaff DW y Sakuma Y. 1979a. 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.
- Pfaus JG, Marcangione C, Smith WJ, Manitt C y Abillamaa H. 1996. Differential induction of Fos in the female rat brain following different amounts of vaginocervical stimulation: modulation by steroid hormones. *Brain Res* 741: 314-330.
- Philibert D, Ojasoo T, y Raynaud J. 1977. Properties of the cytoplasmic progestin-binding protein in the rabbit uterus. *Endocrinology* 101: 1850-1861.
- Piwnica-Worms H, Saunders KB, Roberts TM, Smith AE y Cheng SH. 1987. Tyrosine phosphorylation regulates the biochemical and biological properties of pp60c-src. *Cell* 49: 75-82.
- 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, Nicolin A y Maggi A. 1993. Antisense oligonucleotide blocks progesterone-induced lordosis behavior in ovariectomized rats. *Brain Res Mol Brain Res* 19: 135-139.
- Powers B y Valenstein ES. 1972. Sexual receptivity: facilitation by medial preoptic lesions in female rats. *Science* 175: 1003-1005.
- Powers JB. 1970. Hormonal control of sexual receptivity during the estrous cycle of the rat. *Physiol Behav* 5: 831-835.
- 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.
- Quesada A, Lee BY y Micevych PE. 2008. PI3 kinase/Akt activation mediates estrogen and IGF-1 nigral DA neuronal neuroprotection against a unilateral rat model of Parkinson's disease. *Dev Neurobiol* 68: 632-644.
- 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 signaling 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.
- Riskind P y Moss RL. 1983. Midbrain LHRH infusions enhance lordotic behavior in ovariectomized estrogen-primed rats independently of a hypothalamic responsiveness to LHRH. *Brain Res Bull* 11: 481-485.

- Robertson JA, Farnell Y, Lindahl LS y Ing NH. 2002. Estradiol up-regulates estrogen receptor messenger ribonucleic acid in endometrial carcinoma (Ishikawa) cells by stabilizing the message. *J Mol Endocrinol* 29: 125-135.
- Rodgers CH y Law OT. 1967. The effects of habenular and medial forebrain bundle lesions on sexual behavior. *Psychon Sci* 8: 1-2.
- Rodríguez-Manzo G, Cruz ML y Beyer C. 1986. Facilitation of lordosis behavior in ovariectomized estrogen-primed rats by medial preoptic implantation of 5 beta, 3 beta, pregnanolone: a ring A reduced progesterone metabolite. *Physiol Behav* 36: 277-281.
- Roskoski R. 2010. RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 399: 313-317.
- Roskoski R. 2012. ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 66: 105-143.
- Roskoski R. 2015. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacol Res* 94: 9-25.
- 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.
- Roussel RR, Brodeur SR, Shalloway D y Laudano AP. 1991. Selective binding of activated pp60c-src by an immobilized synthetic phosphopeptide modeled on the carboxyl terminus of pp60c-src. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 10696-10700.
- Rowan BG y O'Malley BW. 2000. Progesterone receptor coactivators. *Steroids* 65: 545-549.
- Rowan BG, Narayanan R y Weigel NL. 2003. Analysis of receptor phosphorylation. *Methods Enzymol* 364: 173-202.
- Roy EJ y Wade GN. 1977. Binding of [3-H] estradiol by brain cell nuclei and female rat sexual behavior: inhibition by antiestrogens. *Brain Res* 126: 73-87.
- Sakuma Y y Pfaff DW. 1979a. Facilitation of female reproductive behavior from mesencephalic central gray in the rat. *Am J Physiol* 237: R278-R284.
- Sakuma Y y Pfaff DW. 1979b. Mesencephalic mechanisms for integration of female reproductive behavior in the rat. *Am J Physiol* 237: R285-R290.
- Sausbier M, Schubert R, Voigt V, Hirneiss C, Pfeifer A, Korth M, Kleppisch T, Ruth P y Hofmann F. 2000. Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ Res* 87: 825-830.

- Schwartz SM, Blaustein JD y Wade G. 1979. Inhibition of estrous behavior by progesterone in rats: role of neural estrogen and progestin receptors. *Endocrinology* 1078-1082.
- Segovia S, Garcia-Falgueras A, Perez-Laso C, Pinos H, Carrillo B, Collado P, Claro F y Guillamon A. 2009. The effects of partial and complete masculinization on the sexual differentiation of nuclei that control lordotic behavior in the male rat. *Behav Brain Res* 196: 261-267.
- Sellix MT, Egli M, Henderson RP y Freeman ME. 2004. Ovarian steroid hormones modulate circadian rhythms of neuroendocrine dopaminergic neuronal activity. *Brain Res* 1005: 164-181.
- Shen T, Horwitz KB y Lange CA. 2001. Transcriptional hyperactivity of human progesterone receptors is coupled to their ligand-dependent down-regulation by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of serine 294. *Mol Cell Biol* 21: 6122-6131.
- Shingo AS y Kito S. 2005. Estradiol induces PKA activation through the putative membrane receptor in the living hippocampal neuron. *J Neural Transm (Vienna)* 112: 1469-1473.
- Shughrue PJ, Bushnell CD y Dorsa DM. 1992. Estrogen receptor messenger ribonucleic acid in female rat brain during the estrous cycle: a comparison with ovariectomized females and intact males. *Endocrinology* 131: 381-388.
- 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.
- Sica M, Martini M, Viglietti-Panzica C y Panzica G. (2009). Estrous cycle influences the expression of neuronal nitric oxide synthase in the hypothalamus and limbic system of female mice. *BMC Neurosci* 10: 78-89.
- Sicheri F, Moarefi I y Kuriyan J. 1997. Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature* 385: 602-609.
- Siegel S y Castellan N. 1995. *Estadística no Paramétrica Aplicada a las Ciencias de la Conducta*. Editorial. Trillas. México.
- Silberbach M y Roberts JCT. 2001. Natriuretic peptide signalling molecular and cellular pathways to growth regulation. *Cell Signal* 13: 221-231.
- Sinchak K y Micevych PE. 2001. Progesterone blockade of estrogen activation of mu-opioid receptors regulates reproductive behavior. *J Neurosci* 21: 5723-5729.

- Singer JJ. 1968. Hypothalamic control of male and female sexual behavior in female rats. *J Comp Physiol Psychol* 66: 738-742.
- Singh M. 2001. Ovarian hormones elicit phosphorylation of Akt and extracellular-signal regulated kinase in explants of the cerebral cortex. *Endocrine* 14: 407-415.
- Skafar DF y Koide S. 2006. Understanding the human estrogen receptor-alpha using targeted mutagenesis. *Mol Cell Endocrinol* 246, 83-90.
- 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.
- Snyder SH. 1992. Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters. *Science* 257: 494-496.
- Strissel PL y Strick R. 2005. Multiple effects of bioflavonoids on gene regulation, cell proliferation and apoptosis: natural compounds move into the lime light of cancer research. *Leuk Res* 29: 859-861.
- Takimoto GS, Graham JD, Jackson TA, Tung L, Powell RL, Horwitz LD y Horwitz KB. 1999. Tamoxifén resistant breast cancer: coregulators determine the direction of transcription by antagonist-occupied steroid receptors. *J Steroid Biochem and Mol Biol* 69: 45-50.
- Tasken K y Aandahl EM. 2004. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev* 84: 137-167.
- Taylor SS, Ilouz R, Zhang P y Kornev AP. 2012. Assembly of allosteric macromolecular switches: lessons from PKA. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 646-658.
- Terasawa E y Kenealy BP. 2012. Neuroestrogen, rapid action of estradiol, and GnRH neurons. *Front Neuroendocrinol* 33: 364-375.
- Tetel MJ, Getzinger MJ y Blaustein JD. 1993. Fos expression in the rat brain following vaginal-cervical stimulation by mating and manual probing. *J Neuroendocrinol* 5: 397-404.
- 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.
- Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F y Giguère V. 1997. Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol* 11: 353-365.

- Tsukahara S y Yamanouchi K. 2001. Neurohistological and behavioral evidence for lordosis-inhibiting tract from lateral septum to periaqueductal gray in male rats. *J Comp Neurol* 431: 293-310.
- Tsukahara S y Yamanouchi K. 2002. Sex difference in septal neurons projecting axons to midbrain central gray in rats: a combined double retrograde tracing and ER-immunohistochemical study. *Endocrinology* 143: 285-294.
- Tsukahara S, Ezawa N y Yamanouchi K. 2003. Neonatal estrogen decreases neural density of the septum-midbrain central gray connection underlying the lordosis-inhibiting system in female rats. *Neuroendocrinology* 78: 226-233.
- Tupal S y Faingold CL. 2012. The amygdala to periaqueductal gray pathway: plastic changes induced by audiogenic kindling and reversal by gabapentin. *Brain Res* 147:, 71-79.
- Uhler MD. 1993. Cloning and expression of a novel cyclic GMP-dependent protein kinase from mouse brain. *J Biol Chem* 268: 13586-13591.
- Ushiro H y Cohen S. 1980. Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *J Biol Chem* 255: 8363-8365.
- Vaandrager AB, Hogema BM y de Jonge HR. 2005. Molecular properties and biological functions of cGMP-dependent protein kinase II. *Front Biosci* 10: 2150-2164.
- VanderHorst VG, Terasawa E y Ralston HJ. 2004. Projections from estrogen receptor-alpha immunoreactive neurons in the periaqueductal gray to the lateral medulla oblongata in the rhesus monkey. *Neuroscience* 125: 243-253.
- Veening JG y Coolen LM. 1998. Neural activation following sexual behavior in the male and female rat brain. *Behav Brain Res* 92: 181-193.
- 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.
- Vida B, Hrabovszky E, Kalamatianos T, Coen CW, Liposits Z y Kalló I. 2008. Oestrogen receptor alpha and beta immunoreactive cells in the suprachiasmatic nucleus of mice: distribution, sex differences and regulation by gonadal hormones. *J Neuroendocrinol* 20: 1270-1277.
- Wade GN y Blaustein JD. 1978. Effects of an anti-estrogen on neural estradiol binding and on behaviors in female rats. *Endocrinology* 102: 245-251.

- Wei LL, Gonzalez-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, P_{Rc}, 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.
- Welch EJ, Jones BW y Scott JD. 2010. Networking with AKAPs: context-dependent regulation of anchored enzymes. *Mol Interv* 10: 86-97.
- Wernet W, Flockerzi V y Hofmann F. 1989. The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett* 251: 191-196.
- West Virginia University Acuc Policy Anesthesia, Surgery and Post-Operative Care of Rats and Mice. 2012.
- 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.
- Whalen RE. 1974. Estrogen-progesterone induction of mating in female rats. *Horm Behav* 5: 157-162.
- Whalen RE y Lauber AH. 1986. Progesterone substitutes: cGMP mediation. *Neurosci Biobehav Rev* 10: 47-53.
- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB y Johnson GL. 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79: 143-180.
- 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.
- Witcher JA, Nearhoof KF y Freeman ME. 1984. Secretion of luteinizing hormone (LH) and pituitary receptors for LH-releasing hormone as modified by the proestrous surge of progesterone. *Endocrinology* 115: 2189-2194.
- Wu H, Shen HW, Wu TF, Brass LF y Sung KC. 2002. Extracellular signal-regulated kinases and g protein-coupled receptors in megakaryocytic human erythroleukemia cells: selective

- activation, differential regulation, and dissociation from mitogenesis. *J Pharmacol Exp Ther* 300: 339-345.
- Wu TW, Wang JM, Chen S y Brinton RD. 2005. 17Beta-estradiol induced Ca²⁺ influx via L-type calcium channels activates the Src/ERK/cyclic-AMP response element binding protein signal pathway and BCL-2 expression in rat hippocampal neurons: a potential initiation mechanism for estrogeninduced neuroprotection. *Neuroscience* 135: 59-72.
- Wunsch S. 2014. Comprendre les origines de la sexualité humaine neurosciences, éthologie, anthropologie. Editorial. Le´ Espiritu du tempus. France.
- Xiao K, Kondo Y y Sakuma Y. 2005. Differential regulation of female rat olfactory preference and copulatory pacing by the lateral septum and medial preoptic area. *Neuroendocrinology* 81: 56-62.
- Xu W, Harrison SC y Eck MJ. 1997. Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385: 595-602.
- Yanase M y Gorski RA. 1976. Sites of estrogen and progesterone facilitation of lordosis behavior in the spayed rat. *Biol Reprod* 15: 536-543.
- Yang J, Singleton DW, Shaughnessy EA y Khan SA. 2008. The F-domain of estrogen receptor-alpha inhibits ligand induced receptor dimerization. *Mol Cell Endocrinol* 295: 94-100.
- Yang SP y Voogt JL. 2002. Mating-activated nitric oxide-producing neurons in specific brain regions in the female rat. *Brain Res* 950: 79-87.
- Yuasa K, Omori K y Yanaka N. 2000. Specific domain of cGMP-dependent protein kinase Ibeta but not Ialpha functions as a transcriptional activator in yeast. *IUBMB Life* 49: 17-22.
- 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.
- Zhang J y Snyder SH. 1995. Nitric oxide in the nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 213-233.
- Zhang Y, Beck CA, Poletti A, Clement IV JP, Prendergast 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.

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

ADN	Acido desoxirribonucleico
AHM	Hipotálamo anteromedial
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
APOm	Área preóptica media
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Trifosfato de adenosina
ATV	Área tegmental ventral
BE	Benzoato de 17- β estradiol
CL	Conducta de lordosis
DMSO	Dimetil sulfoxido
ERP	Elementos de respuesta a la progesterona
FA-1	Función de activación 1
FA-2	Función de activación 2
FA-3	Función de activación 3
FRM	Formación reticular mesencefálica
FSH	Hormona folículo estimulante
GDP	Difosfato de Guanosina
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
GTP	Trifosfato de guanosina
HSP	Proteínas de choque térmico
HVM	Hipotálamo ventromedial
icv	Vía de administración intracerebroventricular
KT5823	Inhibidor de la proteína cinasa G
LH	Hormona luteinizante
LQ	Cociente de lordosis
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
mg	Miligramos
MSRE	Modulador selectivo de los receptores a estrógenos
ng	Nanogramos

OVX	Ovariectomía
P450scc	Enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol
PAG	Sustancia gris periacueductal
PD98059	Inhibidor de la MAPK
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PKG	Proteína cinasa G
PP2	Inhibidor de la proteína cinasa Src
RE	Receptores a estrógenos
RE- α	Receptor- α a estrógenos
RE- β	Receptor- β a estrógenos
RP	Receptor a progesterona
RP-A	Isoforma A del receptor a progesterona
RP-B	Isoforma B del receptor a progesterona
RP-C	Isoforma C del receptor a progesterona
RpcAMPs	Inhibidor de la proteína cinasa A
RU486	Antagonista del receptor a progesterona
sc	Vía de administración subcutanea
Src	Proteína cinasa Src
Tamoxifén	Modulador selectivo de los receptores a estrógenos
μ g	Microgramos
vld	ventrículo lateral derecho

13. ANEXOS

13.1 Ponencias

13.1.1. Las cinasas A, G y MAPK median la conducta de lordosis inducida por 17- β estradiol. Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. 6-9/9/2015.



SOCIEDAD MEXICANA DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS A.C.
FUNDADA EN 1957

México, D.F., a 28 de julio de 2015.

DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA
PRESIDENTE

DR. MIGUEL ÁNGEL MORALES
MENDOZA
VICEPRESIDENTE

DR. DANIEL ORTUÑO SAHAGÚN
SECRETARIO

DR. BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO
TESORERO

Raymundo Domínguez Ordóñez
Universidad Autónoma de Tlaxcala-CINVESTAV
PRESENTE

Estimado (a) Congresista:

Le informamos que el trabajo titulado:
"Las cinasas A, G y MAPK median la conducta de lordosis inducida por 17- β estradiol", cuyos co-autores son:
Domínguez Ordóñez Raymundo, García Juárez Marcos, Gómora Arrati Porfirio, Lima Hernández Francisco Javier, y González Flores Oscar

Ha sido ACEPTADO para ser presentado durante el LVIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, que se celebrará del 6 al 9 de septiembre próximo en la ciudad de San Miguel de Allende, Guanajuato, en la modalidad de Cartel. El programa final podrán consultarlo próximamente en: <http://www.smcf.org.mx/>

Reciba de antemano nuestro reconocimiento por su valiosa participación, además de un cordial saludo.

Atentamente,
Por el Comité Organizador

Marcia Hiriart U.

Dra. Marcia Hiriart Urdanivia
Presidente

13.1.2. La lordosis inducida por estradiol es modulada por los receptores a estrógenos y a progesterona. Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. 31/8- 4/9/2014.



**LVII CONGRESO NACIONAL
SOCIEDAD MEXICANA DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS**

Otorga la presente

CONSTANCIA

a:

Raymundo Domínguez Ordóñez

Quien asistió y presentó el trabajo

La lordosis inducida por estradiol es modulada por los receptores a estrógenos y a progesterona

Por:

Domínguez Ordóñez Raymundo, GómoraArrati Porfirio, Lima Hernández Francisco Javier,
García Juárez Marcos, González Flores Oscar

En la modalidad de presentación oral durante el

LVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas.
Agosto 31 a Septiembre 4, 2014 en Oaxaca, Oax.

Atentamente

Por el Comité Organizador

Marcia Hirriart L.

Dra. Marcia Hirriart Urdanivia

13.1.3. Mecanismos celulares involucrados en la facilitación de la conducta de lordosis inducida por la administración de estradiol en la rata. Seminario del Posgrado en Ciencias Biológicas UAT. 19/9/2014



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado
Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta



Otorga la presente

CONSTANCIA

A Raymundo Domínguez Ordoñez
Estudiante Doctorado en Ciencias Biológicas
Universidad Autónoma de Tlaxcala

Por impartir el seminario

"Mecanismos celulares involucrados en la facilitación de la conducta de lordosis inducida por la administración de estradiol en la rata"

Tlaxcala, Tlax., septiembre 19 de 2014

Dr. Jorge Rodríguez Antolín
Coordinador General de Posgrado



56
congreso
nacional
de ciencias
fisiológicas

Tlaxcala, Tlax. Septiembre 1-5 2013



Otorga la presente
Constancia

A: Domínguez-Ordóñez R, Gomora-Arrati P, Lima-Hernández FJ, García-Juárez M, Beyer C, González-Flores O

Por la presentación del **cartel** titulado:

La conducta de lordosis inducida por estradiol libre en la rata es dependiente de la dosis de benzoato de estradiol utilizada en el pretratamiento

Dra. Gabriela González Mariscal Muriel
Presidenta

Dra. Gina Lorena Quirarte
Secretaría

Dra. Yolanda Cruz Gómez
Tesorera

13.1.4. La conducta de lordosis inducida por estradiol libre en la rata es dependiente de la dosis de benzoato de estradiol utilizada en el pretratamiento. Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. 1-5/9/2013.

13.1.5. El estradiol puede facilitar la conducta de estro en ratas ovariectomizadas al actuar a través de los receptores a estrógenos y a progesterona. XXXVIII reunión anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción. 11-14/6/2013.



La Academia de Investigación en Biología de la Reproducción, A.C.

Otorga la presente

Constancia

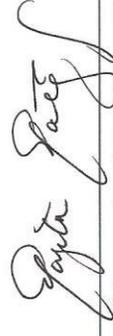
A R Domínguez-Ordóñez, P Gómora-Arrati, RA Lucio, FJ Lima-Hernández, M García-Juárez, C Beyer, O González-Flores

Por la presentación del cartel:

El estradiol puede facilitar la conducta de estro en ratas ovariectomizadas al actuar a través de los receptores a estrógenos y a progesterona

En la XXXVIII Reunión Anual de la AIBIR, llevada a cabo en la ciudad de Cholula, Pue., del 11 al 14 de junio del 2013


Dr. José Ramón Eguibar Cuenca
Presidente


Dra. Margarita Martínez Gómez
Secretaria

13.2. Capítulos en libros

13.2.1. The celular and molecular mechanisms driving the estrogenic modulation of synaptic activity in mnemonic information processing. Synaptic fundamentals of memory performance. 2015.

Chapter

**THE CELLULAR AND MOLECULAR MECHANISMS DRIVING
THE ESTROGENIC MODULATION OF SYNAPTIC ACTIVITY
IN MNEMONIC INFORMATION PROCESSING**

***Oscar González-Flores^{1,*},
Raymundo Domínguez-Ordóñez^{1,2}
and Ignacio González- Burgos³***

¹Centro de Investigación en Reproducción Animal,
UAT-CINVESTAV, IPN. Panotla, Tlaxcala. México

²Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta-
Universidad Autónoma de Tlaxcala. Panotla, Tlaxcala. México

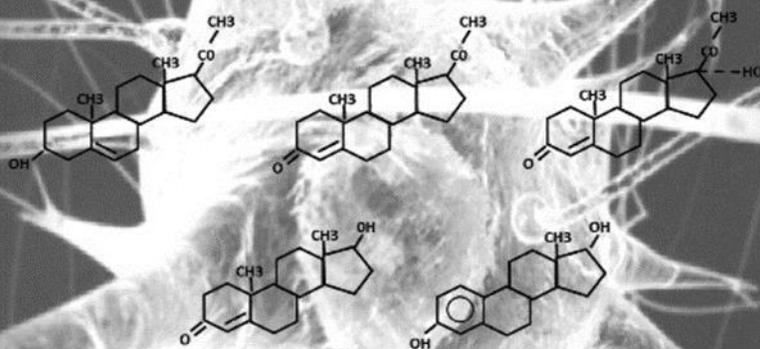
³Laboratorio de Psicobiología, División de Neurociencias,
Centro de Investigación Biomédica de Occidente,
IMSS. Guadalajara, Jal. México

ABSTRACT

Estrogen receptors (ER) can be activated by their natural ligand estradiol (E₂), although several cytoplasmic and nuclear ERs have been

* Send correspondence to: Oscar González-Flores, PhD, Centro de Investigación en Reproducción Animal, Universidad Autónoma de Tlaxcala-CINVESTAV, Instituto Politécnico Nacional. Panotla, Tlaxcala. México. Email: oglezflo@gmail.com

EFFECTO DE LAS HORMONAS ESTEROIDES SOBRE PROCESOS FISIOLÓGICOS Y REPRODUCTIVOS



Oscar González Flores
Ángel I. Melo Salazar

Francisco J. Lima Hernández
Kurt L. Hoffman

13.2.2. Importancia de la proteína cinasa Src sobre la activación de la conducta sexual femenina en la rata. Efecto de las hormonas esteroides sobre procesos fisiológicos y reproductivos. 2015.

CAPÍTULO 1

Importancia de la proteína cinasa Src sobre la activación de la conducta sexual femenina en la rata

**Francisco Javier Lima Hernández^{1,3} Marcos García Juárez¹ Porfirio Gómora Arrati¹
Raymundo Domínguez Ordóñez^{1,2} José Luis Encarnación Sánchez⁴
Oscar González Flores¹**

¹Centro de Investigación en Reproducción Animal, CINVESTAV-UAT

²Doctorado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta-Universidad Autónoma de Tlaxcala,

³Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

⁴Maestría en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta-Universidad Autónoma de Tlaxcala

Introducción

Se sabe que la progesterona (P) actúa sobre las neuronas del hipotálamo ventromedial (HVM) para facilitar el comportamiento de estro (lordosis y proceptividad) en ratas, a través de unirse a el receptor de progesterona (RP) (5,30,73). Sin embargo, la P es rápidamente metabolizada en el cerebro en una variedad de progestinas reducidas en el anillo A, las cuales tienen poca afinidad por el RP (23,57,21). Pero estas progestinas cuando son administradas dentro del cerebro o en los ventrículos cerebrales, son más potentes que la P en inducir el comportamiento sexual en ratas hembras previamente estroge-nizadas (11,8,47). El mecanismo a través del cual estas progestinas reducidas en el anillo A facilitan el comportamiento de estro no es claro. Datos recientes, sugieren que otros mecanismos celulares diferentes a la unión con el RP, participan en la facilitación del comportamiento sexual ocasionado por estos compuestos. Tanto la P, como las progestinas reducidas en el anillo A y otros agentes no esteroideos (e.g. GnRH, PGE2, dopamina, NA etc.) o la estimulación vaginocervical (EVC), pueden activar diversas proteínas cinasas, como son la proteína cinasa A (70,47), la proteína cinasa G (113,27) y la MAPK (31,43,37). Todas estas, han sido implicadas en la expresión de la conducta de estro en ratas. Los datos antes mencionados, sugieren que estos agentes

13.2.3. Estrógenos y conducta sexual femenina en la rata. Efecto de las hormonas esteroides sobre procesos fisiológicos y reproductivos. 2015.

CAPÍTULO 2

Estrógenos y conducta sexual femenina en la rata

Raymundo Domínguez Ordóñez^{1,2}, Francisco Javier Lima Hernández^{1,3}
Oscar González Flores

¹Centro de Investigación en Reproducción Animal, CINVESTAV-UAT

²Doctorado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta-Universidad Autónoma de Tlaxcala,

³Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Introducción

Los estrógenos son hormonas esteroideas que regulan una gran variedad de eventos fisiológicos que van desde la reproducción, hasta funciones especializadas como la cognición y la memoria. Estos eventos se llevan a cabo una vez que estas hormonas activan a sus receptores, de los cuales se conocen distintas isoformas intracelulares y distintos receptores membranales. La amplia variedad de receptores hace muy complejo el entendimiento del mecanismo de acción de estas hormonas.

Debido a que éstos desempeñan un papel fundamental en la fisiología reproductiva de las hembras de mamíferos, consideramos de gran utilidad realizar investigación básica en hembras de roedores, ya que estos mamíferos muestran cualidades excepcionales para el estudio de los mecanismos celulares y moleculares de los estrógenos para regular diversas respuestas reproductivas. A la fecha se han realizado diversos trabajos que han sentado las bases de los mecanismos de acción de estas hormonas en la reproducción, así, Bolling y Blandau a finales de la década de los 30's mostraron que la inyección de estas hormonas a ratas ovariectomizadas seguida por la administración de progesterona restablecía la conducta sexual femenina, sin embargo, trabajos realizados por nuestro Maestro, el Dr. Carlos Beyer, en la década de los 70's mostraron que la inyección de dosis repetidas de estrógenos por 10 días, sin la administración de progesterona, facilitaba la conducta sexual en la rata ovariectomizada, trabajos posteriores realizados por Butcher en los 70's demostraron que existe una variación de la concentración de estrógenos



Biología Celular y Molecular de las Conductas Reproductivas

Diego Espinoza Flores
Ariel Emilio Salazar

Francisco J. Lima Hernández
Kurt L. Hofman

13.2.4. Mecanismos celulares que regulan la expresión de la conducta sexual femenina.
Biología celular y molecular de las conductas reproductivas. 2013.

**MECANISMOS CELULARES QUE REGULAN LA
EXPRESION DE LA CONDUCTA SEXUAL FEMENINA**

Oscar González-Flores¹,
Marcos García-Juárez¹,
Raymundo Domínguez-Ordoñez³,
Guadalupe Rodríguez-Aguayo²,
Francisco Javier Lima-Hernández^{1,4}.

¹Centro de Investigación en Reproducción Animal. CINVESTAV-
Lab. Tlaxcala. Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala.

²Maestría en Ciencias Biológicas, Centro Tlaxcala en Biología
de la Conducta. Universidad Autónoma de Tlaxcala.

³Doctorado Ciencias Biológicas, Centro Tlaxcala en Biología
de la Conducta. Universidad Autónoma de Tlaxcala

⁴Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. . Universidad
Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala.

INTRODUCCIÓN

Las hormonas esteroides, estradiol (E_2) y progesterona (P_4), actúan de manera secuencial y sinérgica en áreas cerebrales como el hipotálamo (HT) y el área preóptica (APO), para regular la conducta sexual femenina (CSF; lordosis y proceptividad) de roedores [1]. Experimentos realizados en estas especies, han mostrado que la conducta de lordosis (CL; dorsiflexión de la columna vertebral) que adopta la hembra durante la receptividad, se debe a los efectos transcripcionales que ejerce el complejo estrógeno-receptor (ER) sobre el ADN en neuronas hipotalámicas [2, 3]. Estas acciones genómicas preparan a dicho sustrato neural para que posteriormente la P_4 (u otros compuestos químicos) facilite la CL, así como, diversas conductas proceptivas (arrancones, brincoteos sobre sus cuatro patas y orejeo).

Entre los genes regulados por E_2 que juegan un papel clave en la regulación hormonal de la lordosis, se encuentran aquellos que codifican para la síntesis del receptor a P_4 (RP), o para los

13.2.5. Modulación de la conducta de estro por el receptor a progesterona en la rata y la coneja. Biología celular y molecular de las conductas reproductivas. 2013.

**MODULACIÓN DE LA CONDUCTA DE ESTRO
POR EL RECEPTOR A PROGESTERONA
EN LA RATA Y LA CONEJA**

*Raymundo Domínguez-Ordóñez¹,
Guadalupe Rodríguez-Aguayo²,
Francisco Javier Lima Hernández^{3,4},
Oscar González-Flores³*

¹Centro de Investigación en Reproducción Animal. CINVESTAV-Lab. Tlaxcala. Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala.

²Maestría en Ciencias Biológicas, Centro Tlaxcala en Biología de la Conducta. Universidad Autónoma de Tlaxcala.

³Doctorado Ciencias Biológicas, Centro Tlaxcala en Biología de la Conducta. Universidad Autónoma de Tlaxcala

⁴Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala.

INTRODUCCIÓN

La P, en las hembras de los mamíferos, modula una gran variedad de efectos relacionados con diversos aspectos de la conducta sexual femenina o también llamada CE. Estos efectos incluyen tanto la estimulación como la inhibición, durante el pro-estro y la gestación, respectivamente. En algunas especies, la P circulante incrementa varios aspectos de la atractividad sexual, ya que puede inducir la secreción de sustancias odoríferas, mientras que en otras especies la inhibe. Asimismo, la P también está involucrada en la estimulación de la conducta maternal y en algunos casos facilita la agresividad.

Las diferentes conductas que modula la P son mediadas por mecanismos moleculares complejos mediante los cuales esta hormona y su receptor ejercen sus efectos. Por ejemplo, la P al unirse a su receptor intracelular, funciona como un factor de transcripción provocando cambios a nivel de la transcripción genica. No obstante, ciertos metabolitos de la P (metabolitos neuroactivos) al actuar sobre la membrana celular pueden mo-

14. PUBLICACIONES

14.1. Sexual receptivity facilitated by unesterified estradiol: dependence on estrogen and progestin receptors and priming dose of estradiol benzoate. Behavioral Neuroscience, 2015.

Behavioral Neuroscience
2015, Vol. 129, No. 6, 777–788

© 2015 American Psychological Association
0735-7044/15/\$12.00 http://dx.doi.org/10.1037/bne0000103

Sexual Receptivity Facilitated by Unesterified Estradiol: Dependence on Estrogen and Progestin Receptors and Priming Dose of Estradiol Benzoate

Raymundo Domínguez-Ordóñez
Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de
Tlaxcala, Tlaxcala, México, and Centro de Investigación en
Reproducción Animal, Universidad Autónoma
de Tlaxcala-CINVESTAV

Marcos García-Juárez, Francisco J. Lima-Hernández,
and Porfirio Gómora-Arrati
Universidad Autónoma de Tlaxcala–Centro de Investigación
y de Estudios Avanzados (CINVESTAV)

Jeffrey D. Blaustein
University of Massachusetts

Oscar González-Flores
Universidad Autónoma de Tlaxcala–Centro de Investigación
y de Estudios Avanzados (CINVESTAV)

In some conditions, female sexual behavior in ovariectomized rats can be induced by continuous exposure of estradiol (E_2) alone or by a single injection of a high dose of the long-lasting, esterified estradiol benzoate (EB). However, there are inconsistencies in the literature on the role of estrogens during priming or in the facilitation on female sexual behavior in EB-primed rats, as well as the cellular mechanisms involved. Either subcutaneous (sc) or intracerebral (icv) administration of some doses of free unesterified E_2 , induced lordosis in EB-primed rats. Either sc or icv injection of E_2 , immediately prior to testing, induced high levels of sexual receptivity when the female rats were primed with an EB sc injection of 2 μ g EB. The roles of progesterone receptor (PR) and estrogen receptor on lordosis induced by sc or icv administration of E_2 were explored. Tamoxifen or RU486 administrated sc or icv; each reduced lordosis induced by E_2 . Similarly, antisense oligonucleotides directed at PR-B or total PR (PR-A + PR-B) administrated icv immediately before EB injection inhibited lordosis induced by daily injections of EB. These results suggest that lordosis facilitated by free E_2 is dependent on priming dose of EB. Furthermore both ERs and PRs are involved in this action of E_2 .

Keywords: lordosis, estradiol, estradiol benzoate, estrogen receptor, progesterone receptor

Female sexual behavior in both ovariectomized (ovx) and gonadally intact female rats is induced by the combined action of estradiol (E_2) and progesterone (P; Boling & Blandau, 1939; Beach, Etkin, & Rasquin, 1942). During the proestrous phase of the estrous cycle, plasma E_2 levels increase reaching peak through

early proestrus, while P secretion also increases toward the end of proestrus (Yoshinaga, Hawkins, & Stocker, 1969; Butcher, Collins, & Fugo, 1974) prior to the onset of the expression of female sexual behavior. In ovx rats, exogenous sequential administration of E_2 and P synergize, inducing the expression of sexual receptivity typically to a sexually active male (Beach et al., 1942; Boling & Blandau, 1939; Morali & Beyer, 1979).

In some conditions, the administration of E_2 can substitute for P in the facilitation of female sexual behavior in ovx rats, for example, (a) when rats that have been ovx and adrenalectomized to eliminate peripheral sources of P, are exposed continuously to E_2 for an extended period of time (e.g., injected with low doses for several days; Davidson, Rodgers, Smith, & Bloch, 1968; Edwards, Whalen, & Nadler, 1968; Beyer, Morali, & Vargas, 1971); (b) when rats are exposed to a single injection of a high dose of the long-lasting estrogen, estradiol benzoate (EB; Zemlan & Adler, 1977); and (c) when rats receive a second high dose of EB (Kow & Pfaff, 1975) or E_2 , in place of P, after an initial low priming of EB (Blaustein, Finkbohner, & Delville, 1987; Kow & Pfaff, 1975; Parsons, Rainbow, Snyder, & McEwen, 1984). These results indicate that, in the induction of lordosis in female rats, E_2 can act to both prime response to P and facilitate response in rats that have been primed with estrogen.

It has been suggested that the E_2 that females receive during the priming period, must be retained in brain areas involved in regu-

This article was published Online First October 26, 2015.

Raymundo Domínguez-Ordóñez, Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala and Centro de Investigación en Reproducción Animal, Universidad Autónoma de Tlaxcala-CINVESTAV; Marcos García-Juárez, Francisco J. Lima-Hernández, and Porfirio Gómora-Arrati, Centro de Investigación en Reproducción Animal, Universidad Autónoma de Tlaxcala-CINVESTAV; Jeffrey D. Blaustein, Center for Neuroendocrine Studies and Department of Psychological and Brain Sciences, University of Massachusetts; Oscar González-Flores, Centro de Investigación en Reproducción Animal, Universidad Autónoma de Tlaxcala-CINVESTAV.

We gratefully acknowledge the technical assistance of Guadalupe Domínguez-López. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Grant Number 134291. Raymundo Domínguez-Ordóñez received a fellowship from CONACYT Grant Number 230658.

Correspondence concerning this article should be addressed to Oscar González-Flores, Centro de Investigación en Reproducción Animal, Universidad Autónoma de Tlaxcala-CINVESTAV, Apartado Postal Number 62, Tlaxcala, c.p. 90000, México. E-mail: oglezfo@gmail.com

lating the expression of lordosis, such as the hypothalamus and preoptic area (Bixo, Bäckström, Winblad, Selstam, & Andersson, 1986; Pfaff & Sakuma, 1979; Powers & Valenstein, 1972; Singer, 1968; Yanase & Gorski, 1976) at the time of the expression of sexual behavior. This has been referred to as a "maintenance effect" of E_2 . For instance, when radioactively labeled [3H]EB (which is more effective than unesterified E_2 in inducing lordosis) is injected, it produces a long-lasting (>24 hr) uptake and retention of [3H] E_2 by brain cell nuclei (Landau, 1977). Likewise, Blaustein, Dudley, Gray, Roy, and Wade (1979) demonstrated that long-term retention of E_2 bound to estrogen receptors (ERs) in brain cell nuclei is required at the time of sexual behavior expression. It is reasonable to assume that the effectiveness of the estrogen is in part due to the prolonged, elevated concentration of E_2 in the blood and consequently in the brain.

An alternative hypothesis is that E_2 is only required to prime or prepare these areas for a second dose of hormone facilitating lordosis at a later time. Typically, the facilitating hormone would be P or, as discussed earlier, a second injection of E_2 , which can substitute for the P. Kow and Pfaff (1975) concluded that there are differences between these two modes of E_2 action (i.e., priming and facilitation). For example, the priming effect requires low dosages, 3 μ g or less and latencies longer than 24 hr, whereas facilitation effects require previous E_2 priming, higher dosages of E_2 and only short latency.

Although the specific mechanisms by which estrogens exert their priming effects on lordosis are unknown, a minimal amount of time of 18–24 hr is required. The duration of the estrogen priming period during which sexual receptivity can be facilitated by a second injection depends on the priming dose of E_2 injected. When females receive a high dose of E_2 , sexual behavior can be facilitated by P administration even 96 hr after the injection of EB (Zemlan & Adler, 1977).

The priming effect of E_2 requires, among other proteins, the synthesis of progesterin receptor (PR) in the brain (Blaustein & Feder, 1979; Camacho-Arroyo, Guerra-Araiza, & Cerbón, 1998; Guerra-Araiza, Villamar-Cruz, González-Arenas, Chavira & Camacho-Arroyo, 2003; MacLusky & McEwen, 1978; Parsons, MacLusky, Krey, Pfaff, & McEwen, 1980). Because E_2 has a moderate affinity for the PR (MacLusky & McEwen, 1978), it had been suggested that E_2 can trigger the expression of female sexual behavior in rats primed earlier with E_2 by binding to the PR. In fact, a high dose of E_2 , which induces sexual behavior, causes cell nuclear accumulation of PR in the hypothalamus-preoptic area within 2 hr of injection in female ovx rats that received E_2 for 72 hr via a Silastic capsule containing 100% of E_2 (Parsons, Rainbow, Snyder, & McEwen, 1984). However, results obtained by Blaustein, Finkbohner, and Delville (1987) are not consistent with the hypothesis that E_2 substitutes P in the regulation of sexual behavior by its binding with the PR, because the administration of the PR antagonist, RU486, was not effective in inhibiting sexual behavior induced by either continuous or acute, large doses of E_2 .

There are inconsistencies in the literature on the role of estrogens during priming or in the facilitation on female sexual behavior in estrogen-primed rats, as well as the cellular mechanisms involved. Therefore, in the present study, we addressed the following questions: (a) What dose of unesterified (free) E_2 is required to facilitate lordosis in ovx EB-primed rats? The finding that intracerebral (icv) E_2 significantly facilitated lordosis behavior

in ovx EB-primed rats led us to explore the possible mechanism mediating this response. (b) Does E_2 facilitate sexual behavior in ovx EB-primed rats via ERs or PRs, or are both classes of receptors involved? (c) Is lordosis induced by a second injection of E_2 in EB-primed rats dependent on the priming dose of EB? We suggest that there is a close relationship between EB dose administered during priming and the quality and quantity of lordosis behavior induced by E_2 alone. Further evidence for such a maintenance effect of the priming dose of EB comes from studies showing that supplementary injections of EB given 36 hr after the original dose of EB prolong duration of heat.

In order to answer the first question, we assessed the effectiveness in facilitating lordosis of several doses of E_2 in EB-primed rats. The second question was approached by determining the effects of tamoxifen (TMX; a selective ER modulator) and RU486 (PR antagonist) on lordosis facilitated by E_2 . In addition, we explored the involvement of the two forms of PRs, PR-A and PR-B, in rat estrous behavior induced by repeated doses of EB by using antisense oligonucleotides directed against each PR isoform. Finally, we asked if lordosis behavior induced by E_2 is directly related to the dose of EB the female receives during the priming time and to determine if amounts of E_2 within the general physiological range are sufficient to elicit sexual receptivity in rodents in the absence of P.

Materials and Method

Animals

Three hundred twenty-six sexually inexperienced Sprague Dawley female rats bred at the Centro de Investigación en Reproducción Animal were used. Rats weighed between 230 and 270 g at the onset of the experiment. They were maintained under controlled temperature ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) and light conditions (14-hr light; 10-hr dark; lights off at 1100 hr), and they were fed Purina rat chow and water ad libitum.

Surgical Procedures

All females were ovx under ether anesthesia; 1 week later, 153 were anesthetized with xylazine (4 mg/kg) and ketamine (80 mg/kg) and placed in a Kopf stereotaxic instrument (Tujunga, CA) for implantation of a stainless steel cannula (22 gauge, 17-mm length) into the right lateral ventricle following the coordinates in the atlas of Paxinos and Watson (2006; anteroposterior + 0.80 mm, mediolateral -1.5 mm, dorsoventral -3.5 mm with respect to bregma). Substances administered into this ventricle travel by the foramen of Monro into the third ventricle (Battal et al., 2011), where they can cross the ependymal, penetrating into the arcuate nucleus-median eminence, a circumscribed region of the medio-basal hypothalamus located around the infundibular recess of the third ventricle (Amat et al., 1999). This neuroanatomical region is involved in the induction of lordosis behavior. 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, rats were injected with penicillin (165,000 IU/kg of procaine benzyl penicillin and 55,000 IU/kg of crystalline benzyl

penicillin) for 3 days after surgery. Rats were then housed singly in plastic cages with food and water available ad libitum for recovery and until the day of the experiment. During this time, animals do not show any apparent discomfort due to isolation.

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 Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV).

Chemicals

Esterified EB, unesterified 17 β -estradiol (free E₂), the PR antagonist RU486, and the ER antagonist TMX were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO). EB, free E₂, and TMX were dissolved in sesame oil vehicle, and RU486 was dissolved in sesame oil:benzyl benzoate:benzoic alcohol (80:15:5).

Rats were primed with EB, because esterified estrogens are more potent than free E₂ in eliciting estrous behavior either alone or in combination with P or other compounds (gonadotropin-releasing hormone [GnRH], prostaglandin E₂ [PGE₂], progestins, etc.; Beyer, Morali, & Vargas, 1971; Davidson, Rodgers, Smith, & Bloch, 1968; Lima-Hernández et al., 2014; Ramírez-Orduña, Lima-Hernández, García-Juárez, González-Flores, & Beyer, 2007). In addition, intravenous injection of free [³H]E₂ results in a sharp pulse in uptake in neural target tissues at 1–2 hr followed by a rapid decline to nearly baseline levels by 12–16 hr with barely detectable levels remaining at 24 hr after injection (Blaustein et al., 1979), unlike injection of [³H]EB which produces a long-lasting (>24 hr) maximal uptake of [³H]E₂ by brain cell nuclei.

PR Antisense Oligodeoxynucleotides

Due to the structural characteristics of PR isoforms, whose unique difference is the presence of 164 amino acids in the amino terminal region of PR-B, two sets of sense (total PR [PR-A + PR-B S] and PR-B S) and antisense (PR-A + PR-B As and PR-B As) phosphorothioated oligodeoxynucleotides (ODNs) were synthesized. The sequence of each ODN was as follows: PR-A + PR-B S, 5'-CAA GAT CCT GGC GGG CAT GGT G-3'; PR-A + PR-B As 5'-de CAC CATGCC CGC CAG GAT CTT G-3'. PR-B S, 5'-AAA ATCAGC AGTCGC TGT CCG-3' and PR-B As 5'-CGG ACA GCG ACT GCTGAT TTT-3' (In Vitrogen, Carlsbad, CA). The ODNs used in these experiments contain limited phosphorothioate linkages resulting in increased resistance to nuclease degradation of ODNs. Finally, phosphorothioate-linked antisense ODNs have been reported to be stable in rodent brain for up to 24 hr (Neckers & Whitesell, 1993; Szklarczyk & Kaczmarek, 1995).

Subcutaneous Experiments

Experiment 1: Effects of different free E₂ dosages administration on lordosis in ovx EB-primed rats. This experiment was designed to characterize the effect of free E₂ on lordosis and to establish a dose response curve for the hormone when injected 40 hr after the priming dose of EB. Two weeks after ovx, rats were primed with 5 μ g/100 μ l of EB subcutaneous (sc) 40 hr before free E₂ or vehicle injections (100 μ l). Free E₂ (dissolved in 100 μ l oil) was injected sc at six dose levels into different groups of animals:

0 ($n = 11$, vehicle control), 0.16 ($n = 12$), 0.8 ($n = 12$), 4 ($n = 12$), 20 ($n = 10$), 100 ng ($n = 12$).

Experiment 2: Effects of different dosages of EB during the priming time on lordosis induced with 20 ng of free E₂ in ovx rats. This experiment was designed to determine if different priming doses of EB modify the lordosis induced by sc administration of 20 ng of free E₂ 40 hr later. Two weeks after ovx, groups of rats were injected sc with 100 μ l of oil ($n = 10$) or EB at four dose levels: 0.5 ($n = 11$), 1 ($n = 9$), 2 ($n = 10$), or 5 μ g ($n = 10$) in the same volume of oil. Forty hours later, EB-primed rats were injected sc with 20 ng/100 μ l of free E₂. For statistical purposes, we compared the animals treated with vehicle (oil) during the priming period plus a sc injection of 20 ng of free E₂ 40 hr later with those groups that received different priming doses of EB followed by 20 ng of free E₂ sc 40 hr later.

Experiment 3: Effects of TMX on lordosis induced with 20 ng of free E₂ in ovx EB-primed rats. In this experiment we tested the idea that the activation of lordosis induced by free E₂ in the absence of P is mediated by ERs. Two weeks after ovx, rats were primed with 5 μ g/100 μ l of EB sc. At 39.5 hr after EB administration, we administered three different doses of TMX sc to determine the effective dose to block lordosis induced by an injection of 20 ng of E₂ at 40 hr. Animals received a sc injection of 1 mg ($n = 11$), 5 mg ($n = 11$), or 10 mg ($n = 12$) of TMX in 100 μ l oil, 30 min before a sc injection of 20 ng/100 μ l of free E₂. For statistical purposes, the inhibitory action of TMX was compared with those animals that received an injection of 20 ng of free E₂ from Experiment 1.

Experiment 4: Effects of RU486 on lordosis induced with 20 ng of free E₂ in ovx EB-primed rats. This experiment determined whether estrous behavior facilitated by free E₂ (in the absence of P) injected sc is mediated by activation of PR. Two weeks after ovx, 10 rats were injected sc with 5 μ g of EB /100 μ l oil (hr 0). Thirty-nine hr later, these rats received a sc injection of 5 mg of RU486/400 μ l vehicle. One hr later, the rats received a sc injection of 20 ng of free E₂/100 μ l. The dose of RU486 was selected from previous studies showing its effectiveness in interfering with PR activation (García-Juárez et al., 2011; González-Mariscal, González-Flores, & Beyer, 1989). For statistical purposes, the rats receiving RU486 were compared versus those animals that received an injection of 20 ng of free E₂ in Experiment 1.

Experiment 5: Effects of sense and antisense ODNs to PR-A + PR-B and PR-B on estrous behavior induced by EB repeated doses in ovx rats. Female rats that had been ovx and implanted with an icv cannula (Group 1, $n = 9$) received an icv injection of 1 μ l of saline (ODNs vehicle) and immediately after with 5 μ g of EB sc for 5 days to evaluate lordosis induced by repeated doses of EB. Other groups received similar EB treatment but also received one of the four different sense or antisense ODNs for the PR isoforms described above: Group 2, PR-A + PR-B S ($n = 9$); Group 3, PR-A + PR-B As ($n = 8$); Group 4, PR-B S ($n = 8$); Group 5, PR-B As ($n = 8$). All animals received five icv injections of 1 μ g/ μ l (4 nmol) of ODNs. Injections were made immediately before each EB administration. The ODN dose was selected based on previous studies (Guerra-Araiza et al., 2009). Rats were tested for estrous behavior at 18, 20, and 22 hr following the last EB injection. Rats receiving EB and either sense or antisense ODNs were contrasted statistically with rats receiving

daily administration of EB. All ODNs were injected in a volume of 1 μ l.

Intracerebral Experiments

Experiment 6: effects of different doses of free E₂ icv on lordosis in ovx EB-primed rats. The objective of this experiment was to characterize the effect of free E₂ on lordosis and to establish a dose response effect for the hormone administered icv. One week after implantation of a cannula into the lateral ventricle, females were primed with 5 μ g of EB/100 μ l oil sc followed 40 hr later with free E₂ or vehicle injections. Free E₂ was injected icv at the following doses in independent groups: oil (control, $n = 12$), 0.016 ($n = 8$), 0.08 ($n = 9$), 0.4 ($n = 8$), 2 ($n = 10$), or 10 ng ($n = 8$). All free E₂ doses were injected in a volume of 1 μ l oil.

Experiment 7: Effects of different dosages of EB during the priming time on lordosis induced with 2 ng of free E₂ icv in ovx rats. This experiment was designed to determine whether different dosages of priming EB modulate the lordosis induced by 2 ng of free E₂ injected icv. One week after implantation of the cannula into the lateral ventricle, groups of females were primed with EB at the following doses: oil (control, $n = 9$), 0.5 ($n = 9$), 1 ($n = 10$), 2 ($n = 10$), or 5 μ g ($n = 10$) injected in a volume of 100 μ l. Forty hr after EB priming, all rats were injected icv with 2 ng of free E₂/ μ l oil.

Experiment 8: Effects of TMX on lordosis induced with 2 ng of free E₂ icv in ovx EB-primed rats. This experiment was designed to test whether lordosis induced by free E₂ injected icv in sc EB-primed rats is also mediated by ERs. One week after implantation of a cannula into the lateral ventricle, female rats ($n = 8$) were primed with 5 μ g of EB/100 μ l oil sc. At 39.5 hr after EB administration, rats received an icv injection of 5 μ g of TMX/ μ l oil ($n = 8$); 0.5 hr later, rats received an icv injection of 2 ng of free E₂. The dose of TMX was selected from previous studies showing its effectiveness in blocking estrous behavior induced by several agents (Lima-Hernández et al., 2014; McKenna, Simon, & Cologer-Clifford, 1992). For statistical purposes, we compared the behavioral responses of animals receiving the TMX versus those received 2 ng of free E₂ from Experiment 6.

Experiment 9: Effects of RU 486 on lordosis induced with 2 ng of free E₂ in ovx EB-primed rats. This experiment was designed to determine whether estrous behavior induced by free E₂ injected icv is mediated by the activation of PR. One week after implantation of a cannula into the lateral ventricle, 10 rats were injected sc with 5 μ g/100 μ l of EB. Thirty-nine hr later, they received an icv injection of 5 μ g/ μ l of RU486. One hr later, the rats received an icv injection of 2 ng of free E₂. For statistical analysis we compared the behavioral responses of animals receiving the RU486 versus those received 2 ng of free E₂ from Experiment 6.

Testing Procedures

Tests for lordosis 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) \times 100] was used to assess receptive behavior. The intensity of lordosis was quantified according to the lordosis score (LS) proposed by Hardy and DeBold (1971). This scale ranged from 0 to

3 for each individual response and, consequently, from 0 to 30 for each female that received 10 mounts from the male. In all experiments, the females were tested at 30, 120, and 240 min after free E₂ injection by an experimenter blind to treatment groups.

Statistical Analysis

To assess the effect of sc (Experiment 1) or icv (Experiment 6) administration of free E₂ and the different priming dose EB (Experiment 2 and 7) versus vehicle, we first used the Kruskal–Wallis test (significance level $p < .05$) for each of the three times tested. Because the LQ and LS values in some groups were not normally distributed, the results obtained at 30, 120, and 240 min were compared using the Mann–Whitney U test (significance level $p < .05$, $p < .01$, and $p < .001$). The effect of the ER antagonist, TMX, and the progestin antagonist, RU486, on the behavioral effects of E₂ was assessed by comparing the LQs obtained with free E₂ alone versus those obtained when TMX and RU486 were added. Wilcoxon's Mann–Whitney U test was used to compare two independent groups (Siegel & Castellan, 1995). We also used this statistical test to compare animals that received repeated EB dosages plus sense ODNs or antisense ODNs. This test is considered to be an excellent alternative to the t test with a power efficiency of 95.5% of the parametric test (Siegel & Castellan, 1995).

Histological Examination of Cannula Placement

Twenty-four hr after completion of the experiments, rats implanted with icv cannula were deeply anesthetized with ether, and 1% methylene blue was administered through the cannula. The brain was removed and sectioned in the transverse plane to confirm the cannula position in the right lateral ventricle. Animals whose cannula was not in the ventricle were discarded from the experiment.

Results

Subcutaneous Experiments

Experiment 1. Weak LQ and LS scores were noted at 30 min postinjection of doses of either 0.8, 20, or 100 ng of free E₂ (see Figure 1). However, the dose of 0.16 and 4 ng induced a statistically significant increase in LQ and LS compared with control group at this time ($p < .05$). A marked increase in lordosis was observed with doses of 0.16 to 20 ng 120 (LQ = $p < .01$; $p < .001$; LS = $p < .01$) and 240 at min postinjection (LQ = $p < .01$; LS = $p < .005$; $p < .01$; $p < .001$). The highest dose (100 ng) did not induce lordosis above vehicle control levels. No proceptive behavior was induced by the sc administration of any dose of free E₂ at any time interval tested (data not shown).

Experiment 2. Administration of 20 ng of free E₂ did not induce lordosis in female rats pretreated with low concentration of EB (0.5 μ g) at the three times tested (see Figure 2). However, the priming doses of 1, 2, or 5 μ g induced intense, dose-dependent lordosis response (LQ and LS) at 120 ($p < .01$; $p < .001$) and 240 min ($p < .01$; $p < .001$) in response to 20 ng of free E₂ at 40 hr.

Experiment 3. Both 5 and 10 mg doses of TMX significantly reduced lordosis (LQ and LS) induced at 2 hr ($p < .5$ and $p < .01$, respectively) facilitated by sc administration of 20 ng of free E₂ in

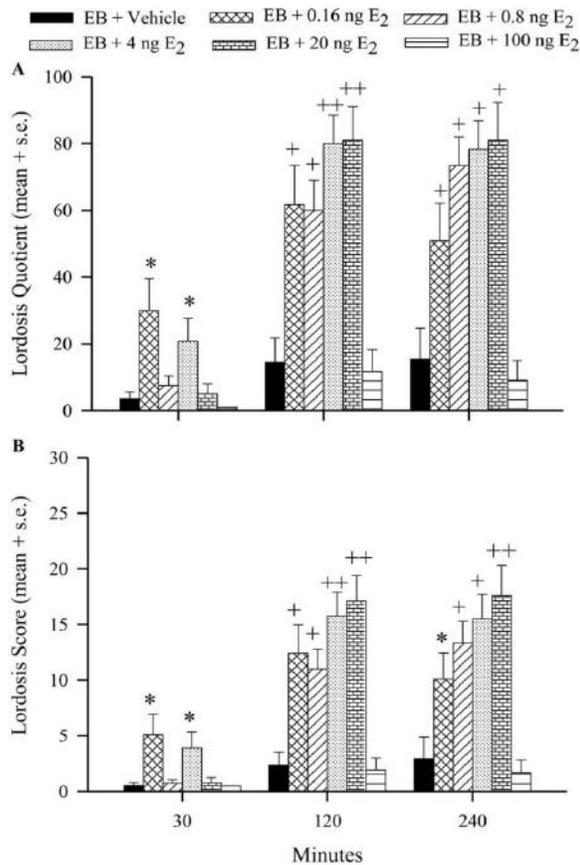


Figure 1. Effect of the subcutaneous injection of 0 (vehicle), 0.16, 0.8, 4, 20, or 100 ng of estradiol (E₂) to ovariectomized estradiol benzoate (EB)-primed rats on lordosis quotient (A); lordosis score (B) at 30, 120, and 240 min after E₂ treatment. * $p < 0.01$. ** $p < 0.001$. + $p < 0.05$ versus control.

EB-primed rats compared with the vehicle control-injected rats, and the dose of 10 mg also blocked lordosis at 4 hr ($p < .01$; see Figure 3). In contrast, 1 mg of TMX was ineffective in inhibiting lordosis induced by sc administration of 20 ng of free E₂ in EB-primed rats.

Experiment 4. The injection of RU486 decreased significantly the LQ and LS induced by 20 ng of free E₂ at 120 min ($p < .01$; Figure 4). The early stand latest time points (30 and 240 postinjection intervals) were not inhibited by RU486 pretreatment. In fact, at 240 min, females showed similar lordosis of those treated with free E₂ plus vehicle.

Experiment 5. Repeated injections of EB (5 μ g daily) for 5 days resulted in a high level of lordosis (Figure 5A) and proceptive behaviors (hopping, darting, ear-wiggling; Figure 5B) at 18, 20, and 22 hr after the last EB injection. Therefore, the percent of females displaying any of these behavioral patterns in each experimental group was used for analyzing proceptivity. A female was considered proceptive when showing at least two of these behavioral patterns in each behavioral session.

As expected, the injections of PR sense ODNs did not significantly modify the estrous behavior induced with EB at any time. In contrast, concurrent administration of antisense ODNs directed at PR-A + PR-B significantly inhibited lordosis induced by EB at 18 ($p < .001$), 20 ($p < .001$) and 22 hr ($p < .01$), when compared with the vehicle control group. Antisense ODNs directed at PR-B also significantly inhibited the lordosis induced by the daily EB administration, compared with sense ODNs to PR-B ($p < .001$ at 18 and 20 hr and $p < .01$ at 22 hr). Proceptive behavior was abolished by either PR-A + PR-B As or the PR-B As at all times tested (Fisher's exact test; $p < .01$).

Intracerebral Free E₂ Experiments

Experiment 6. At 30 min after icv infusion of free E₂ in EB-primed rats, only the dose of 2 ng showed a significant level of

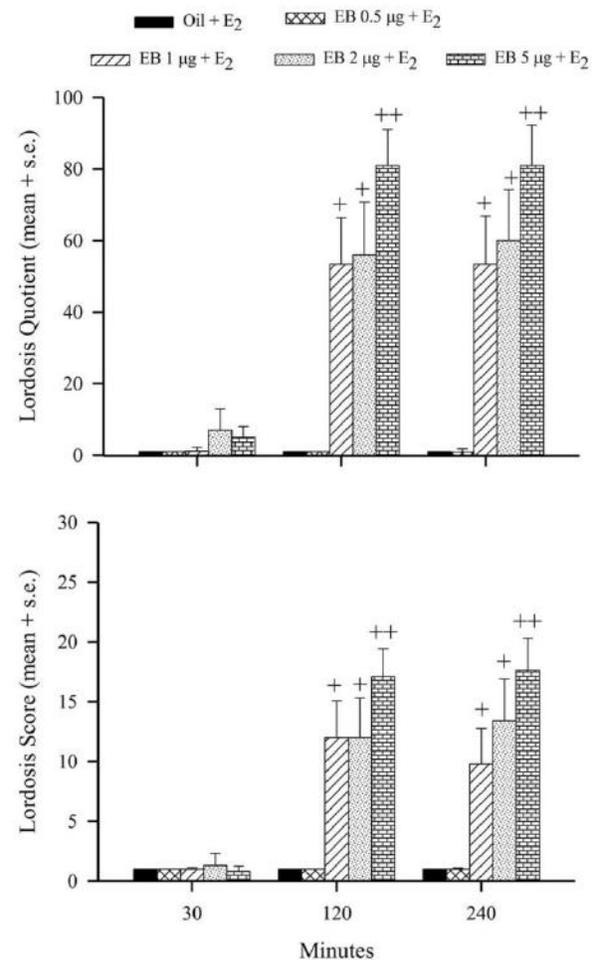


Figure 2. Effect of different priming doses of estradiol benzoate (EB) on the lordosis quotient (A) and lordosis score (B) induced by the subcutaneous administration of 20 ng of estradiol (E₂). Females were injected with either oil (vehicle) or 0.5, 1, 2, or 5 μ g of EB and tested at 30, 120, and 240 min after E₂ treatment. * $p < 0.01$. ** $p < 0.001$ versus control.

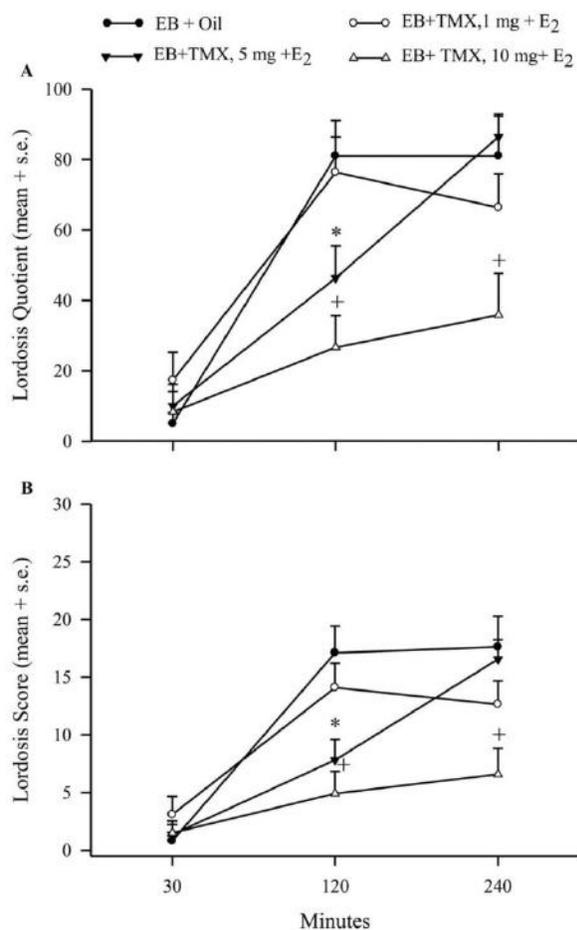


Figure 3. Effect of subcutaneous injection of vehicle or 1, 5, or 10 mg of tamoxifen (TMX), 30 min prior to 20 ng of estradiol (E₂) subcutaneously on the facilitation of lordosis quotient (A) or lordosis score (B). ⁺ $p < 0.01$. * $p < 0.05$ versus control. EB = estradiol benzoate.

lordosis (LQ and LS) compared with the control group ($p < .05$; Figure 6A, 6B). The doses of 0.4, 2, and 10 ng induced lordosis at 120 ($p < .05$; $p < .01$) and 240 ($p < .05$; $p < .01$) min postinjection. Females who received the vehicle expressed very low, baseline levels of lordosis.

Experiment 7. As in Experiment 2, in which the facilitating dose of free E₂ was administered sc, the icv administration of 2 ng did not induce lordosis (LQ and LS) in rats pretreated with a low dose of EB (0.5 μ g) at the three times tested (see Figure 7). Additionally, pretreatment with higher doses of 2 or 5 μ g of EB resulted in clear lordosis at 30 (LQ and LS = $p < .05$; $p < .01$; $p < .001$), 120 (LQ and LS = $p < .05$; $p < .01$; $p < .001$), and 240 (LQ and LS = $p < .001$) min after icv administration of 2 ng of free E₂. However, unlike Experiment 2 where free E₂ was administered sc, the lordosis resulting from icv administration of 2 ng of free E₂ was slightly higher in those females who received a pretreatment of 2 μ g of EB than those who received 5 μ g at all three times tested.

Experiment 8. The TMX reduced significantly the LQ induced by free E₂ at all times tested (Figure 8; $p < .05$). However, the low LS values induced by the free E₂ infusion were only significantly reduced by TMX at 30 min.

Experiment 9. Surprisingly, the LQ and LS values induced by free E₂ were significantly reduced by the injection of RU486 at 120 ($p < .01$) and 240 min ($p < .05$; see Figure 9). LQ and LS scores at the 30-min test of the free E₂ group treated with RU486 did not significantly differ from the low levels observed in rats injected with oil vehicle before the free E₂ infusion.

Discussion

The present results confirm and extend previous findings showing facilitation of lordosis behavior by the sc and icv administration of several doses of free E₂ in female rats pretreated with EB, as well as the involvement of estrogen and P receptors (Boling & Blandau, 1939; Kow & Pfaff, 1975; Lisk, 1962; Micevych, Soma, & Sinchak, 2008; Parsons, Rainbow,

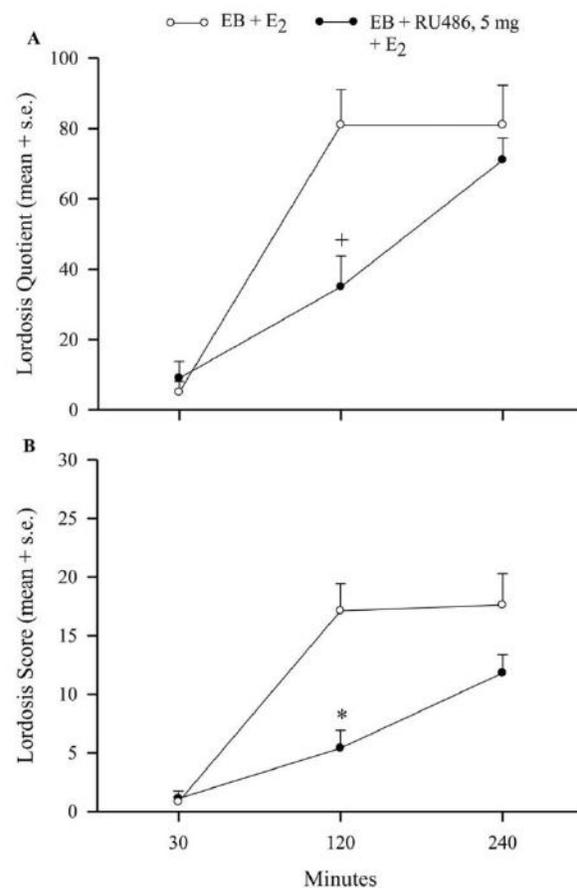


Figure 4. Effect of subcutaneous injection of 5 mg of RU486 or vehicle on the facilitation of both lordosis quotient (A) and lordosis score (B) by 20 ng of estradiol (E₂). RU486 was injected 60 min before E₂. ⁺ $p < 0.01$. * $p < 0.05$ versus control. EB = estradiol benzoate.

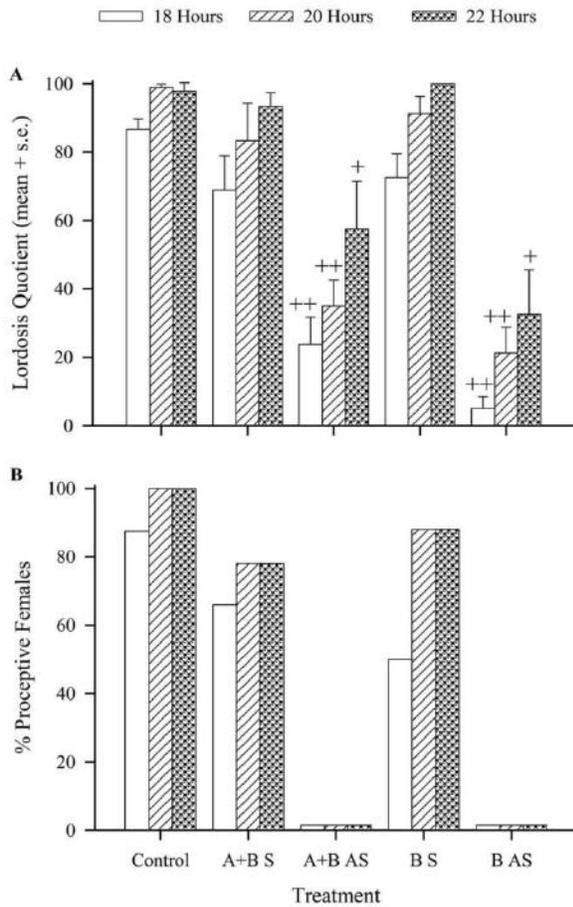


Figure 5. The facilitation of the lordosis quotient (A) and proceptivity (B) in ovariectomized rats by repeated subcutaneous injections of estradiol benzoate (EB) was antagonized by the intracerebral infusion of PR-A + PR-B As or PR-B As, whereas PR-A + PR-B S or PR-B S was not. Sexual behavior was tested 18, 20, and 22 hr after the last EB injection. + $p < 0.01$. ++ $p < 0.001$ versus sense groups.

Snyder, & McEwen, 1984). Initial studies by Kow & Pfaff (1975) showed that very high doses of EB (400 μg) induce intense lordosis in female rats pretreated with 3 μg of EB. It is interesting that, in the present study, the highest sc dose was less effective than the lower doses (see Figure 1). This inverted-U dose response curve was not seen with the icv infusions in which the highest dose of free E_2 induced intense lordosis (see Figure 6). Efficacy of estrogens is of course dependent on the concentration that the target tissue (in this case, the brain) receives, rather than the dose administered (Eaton, Goy, & Resko, 1975; McEwen, Pfaff, Chaptal, & Luine, 1975). Unlike receptor-mediated events, which reach an upper limit of effectiveness when all receptors are occupied, hepatic metabolism may be enhanced with increasing blood levels of a compound (Kuhl, 1990) resulting in lower levels of lordosis with the highest dose of free E_2 .

Some characteristics of the lordosis response induced with P are correlated with the amount of estrogen injected; For example the degree of arching during lordosis increase, the latency to response with lordosis to the male mounting shortens, and the duration of the lordosis posture increase with increasing doses of EB in ovx rats (Zemlan & Adler, 1977). On the other hand, once a threshold dose is reached, the latency to lordosis (interval between estrogen administration and appearance of lordosis) remains more or less constant. However, in some cases, the level of estrous behavior expression bears little or no relationship to the amount of E_2 concentrated in the neural tissues studied (Eaton, Goy, & Resko, 1975). That is, high concentrations of brain estrogens are not necessarily associated with vigorous lordosis, suggesting that the duration of exposure in addition to brain concentration of E_2 or ERs is a critical factor (Blaustein et al., 1979; McEwen, Pfaff, Chaptal, & Luine, 1975; Roy & Wade, 1977). This could be the case with the results obtained with the high sc doses of free E_2 and could be confirmed with icv results, where the administration of the highest three doses induced similar responses. This suggests

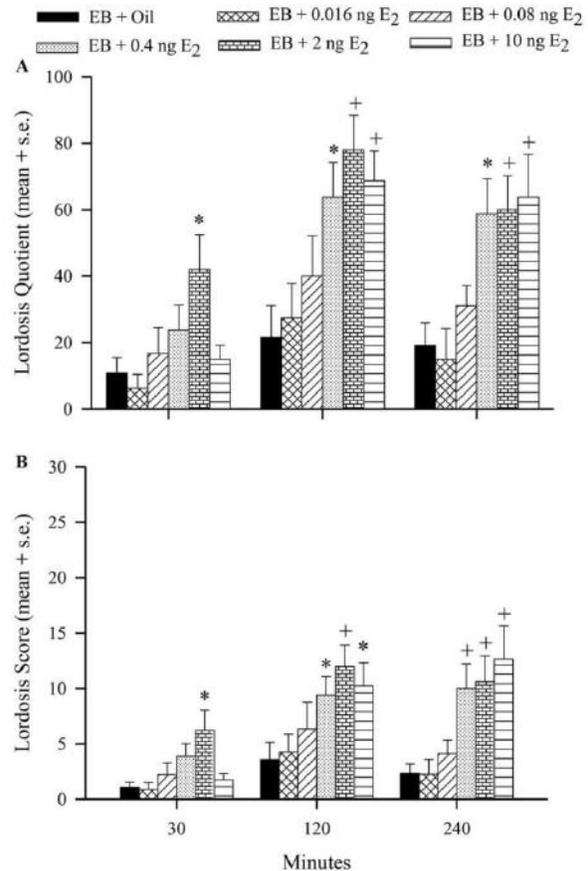


Figure 6. Dose-response curve of vehicle or 0.016, 0.08, 0.04, 2, or 10 ng of estradiol (E_2) intracerebral on the lordosis quotient (A) and lordosis score (B) of ovariectomized estradiol benzoate (EB)-primed rats. Rats were tested at 30, 120, and 240 min after E_2 or vehicle injection. + $p < 0.01$. * $p < 0.05$ versus control.

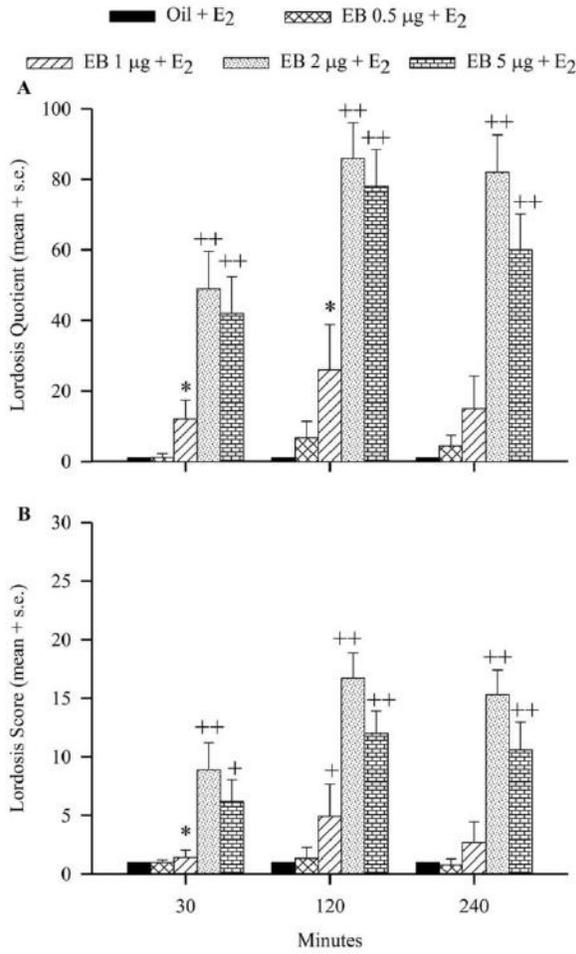


Figure 7. Effect of intracerebral infusion of 2 ng of estradiol (E₂) on the lordosis quotient (A) and lordosis score (B) of ovariectomized rats primed 40 earlier with vehicle or 0.5, 1, 2, or 5 µg of estradiol benzoate (EB). Rats were tested at 30, 120, and 240 min after E₂ treatment. + $p < 0.01$. ++ $p < 0.001$. * $p < 0.05$ versus control.

saturation of ER. Therefore, our data are consistent with earlier studies that showed free E₂ can substitute for P to induce receptive behaviors (Lisk, 1962; Parsons, Rainbow, Snyder, & McEwen, 1984). Conversely, free E₂ failed to elicit full estrous behavior in estrogen-primed rats. That is to say, proceptivity was seldom observed in those rats receiving the steroid. Furthermore, the proceptive component of sexual behavior is primarily affected by P dose rather than estrogen dose (Fadem, Barfield, & Whalen, 1979; Whalen, 1974). Although in this experiment the females showed clear lordosis with only the estrogen, without P, proceptivity (hopping, darting, and ear wiggling) rarely if ever occurs in the absence of P. This paradoxical feature of free E₂, facilitating lordosis without proceptivity, suggests that the hormone can directly or indirectly dissociate neural mechanism that under normal conditions function together and synergistically with P.

In recent studies (Jones, Farrell, Gregory, & Pfau, 2013; Jones & Pfau, 2014), the effects of chronic administration of EB alone was explored in sexually experienced Long-Evans and Wistar rats. Ovx rats were administered high doses of EB (10 µg) every 4 days for eight sessions, all females displayed much higher levels of sexual receptivity than after a single injection, suggesting to the authors that repeated administration of EB induces a phenomenon defined as sensitization.

The present results demonstrate that treatment with the selective ER modulator, TMX, attenuates lordosis facilitated by free E₂. Previous studies have shown that TMX, when administered peripherally or into the brain, produces inhibition of P-activated lordosis behavior in female rats (Etgen, 1979; Etgen & Shamamian, 1986; Howard, Etgen & Barfield, 1984). However, TMX implants into ventromedial hypothalamus, but not in preoptic area, inhibit lordosis behavior induced by EB and P (Howard, Etgen & Barfield, 1984). Also both routes of administration produce a decrease in estrogen and P receptors (Da Vies, Syne, & Nicholson, 1979; Etgen & Shamamian, 1986; Jordan, Dix, Rowsby, & Prest-

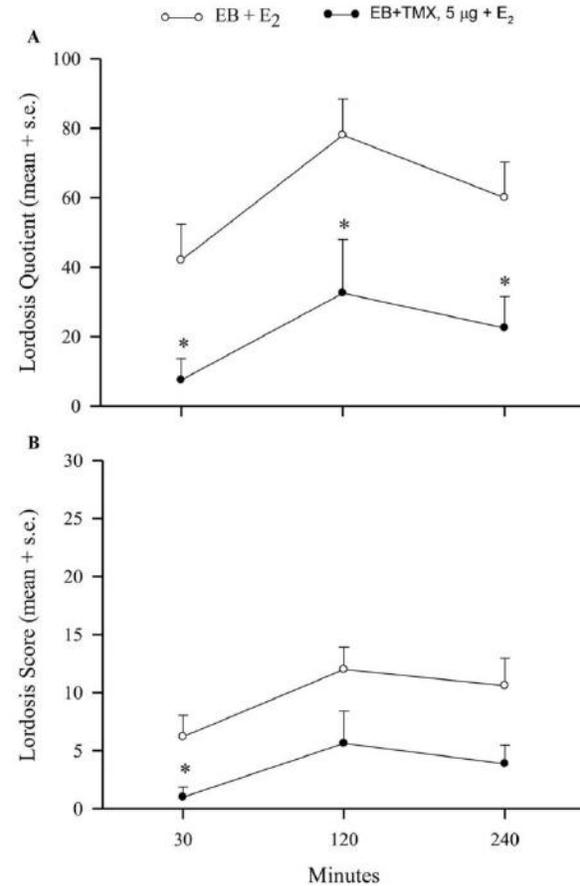


Figure 8. The facilitation of lordosis quotient (A) and lordosis score (B) in ovariectomized estradiol benzoate (EB)-primed rats facilitated by estradiol (E₂) is inhibited by the intracerebral infusion of 5 µg tamoxifen 30 min before E₂ application. * $p < 0.05$ versus control. TMX = tamoxifen.

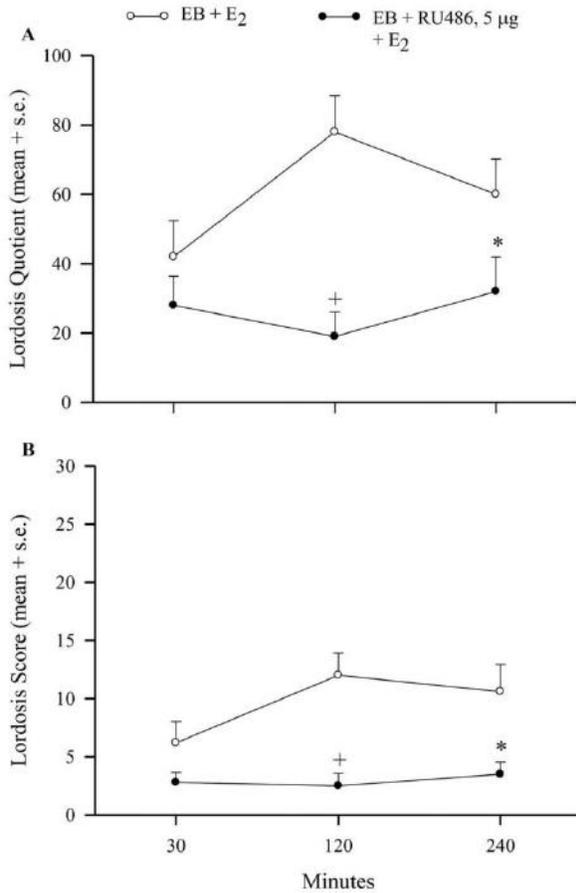


Figure 9. Lordosis quotient (A) and lordosis score (B) elicited by the intracerebral injection of 2 ng of estradiol (E₂) at 120 and 240 min was inhibited by the intracerebral infusion of 5 µg of RU486. + $p < 0.01$. * $p < 0.05$ versus control. EB = estradiol benzoate.

wich, 1977; Koseki, Zava, Chamness, & McGuire, 1977; Kurl & Morris, 1978) and reduced hypothalamic uptake of [3H]E₂ (Chazal, Faudon, Gogan, & Rotsztein, 1975), as well as a concomitant reduction in lordosis (Etgen, 1979; Landau, 1977; Roy & Wade, 1977; Wade & Blaustein, 1978). Most of these studies were performed by administering the antiestrogen around the time of the estrogen priming injection. However, in other studies (Blaustein et al., 1979; Feder & Morin, 1974) in which the antiestrogen was injected near the time of P injection in E₂-primed rats, the antiestrogen inhibited lordosis. We recently reported similar results; concurrent icv infusion of TMX significantly inhibited lordosis and proceptivity induced by most progestins, GnRH, PGE₂, and leptin (Lima-Hernández et al., 2014). These findings strongly suggest the participation of classical ERs many hours after the priming injection of EB in estrous behavior elicited by these compounds.

Currently, little information exists on the participation of the ER isoforms (ER α and ER β) in the regulation the expression of female sexual behavior. However, ER α -knockout (ER α KO) fe-

males express lower levels of lordosis than wild type females (Kudwa & Rissman, 2003), while ER β KO females exhibited high levels of sexual receptivity (Ogawa et al., 1998; Kudwa & Rissman, 2003). These results indicate that female sexual behavior is dependent on the classical ER α , and not ER β . However, we are currently exploring the involvement of each form of ER in our model in which free E₂ may substitute for the facilitating effect of P on lordosis. Thus, we found in preliminary work that icv administration of propylpyrazole-triol and diarylpropionitrile (ER α - and ER- β selective agonist, respectively) each induced clear lordosis behavior in EB-primed rats (unpublished results).

PR is essential for the expression of lordosis, because the antiprogesterin, RU486, inhibits the facilitating effect of a variety of agents besides P (progestins, GnRH, PGE₂, leptin, dopamine) or by mating or vaginocervical stimulation (Auger, Moffatt, & Blaustein, 1997; Beyer, González-Flores, García-Juárez, & González-Mariscal, 2003; Beyer, González-Flores, & González-Mariscal, 1995; Beyer, González-Flores, & González-Mariscal, 1997; García-Juárez et al., 2011; González-Mariscal, González-Flores, & Beyer, 1989; Mani, Allen, Clark, Blaustein, & O'Malley, 1994; Mani & Blaustein, 2012). However, the lordosis induced by free E₂ in estrogen-primed rats, has been controversial, which may be attributable to different treatment schedules used. For example, RU486 was ineffective in inhibiting lordosis in ovx rats treated only with repeated EB doses (3 µg EB/day for 7 days; Beyer et al., 1995). Similar results were found by Blaustein, Finkbohner, and Delville (1987) and recently by Micevych, Soma, and Sinchak (2008): RU 486 did not block the facilitation of sexual behavior induced by chronic exposures of E₂ or by a second administration of E₂ in estrogen-primed rats.

Interestingly, the present results demonstrate that the administration of RU 486 inhibited the lordosis induced by both sc and icv administration of free E₂, suggesting that E₂ facilitates lordosis at least in part through the PR. This is consistent with the data found by Parsons, MacLusky, Krey, Pfaff, and McEwen (1980) in which a high dose of E₂ that facilitated sexual behavior caused cell nuclear accumulation of PR in the hypothalamus-preoptic area 2 hr after injection. Recent results, using a comparative molecular modeling study, showed that the binding energy for the E₂ with human PR-A monomers was considerably higher than that of human PR-A + PR-B dimer (Hasan, Masoodi, Shafi, Alshatwi, & Sivashanmugham, 2011). Thus, results of Experiment 5, in which the icv administration of PR antisense ODNs (PR-A + PR-B As and PR-B As) blocked lordosis induced by repeated doses of EB, supports the idea that the facilitation of lordosis by E₂ is mediated by PR. Consistent with this finding, we recently found that lordosis induced by ring A reduced progestins, which have poor or no binding by the PR, was inhibited by icv administration of either PR-A + PR-B As or PR-B As ODNs (Guerra-Araiza et al., 2009). Administration of the PR antisense ODNs, prior to each injection of EB would be expected to decrease the synthesis of PRs, and in turn, lordosis. This idea was supported by results obtained with western blots (Guerra-Araiza et al., 2009), in which we found that in the hypothalamus and preoptic area, the content of both PR isoforms was diminished by the administration of PR antisense oligonucleotides.

Although the data suggest that PRs are involved in the facilitation of lordosis by free E₂ in EB-primed rats, the mechanism through which this occurs is not clear. A significant problem is the

mechanism by which different steroid receptors interact in the same cell to trigger a signal transduction cascade in response to binding steroid hormone. One of the better characterized extranuclear signaling actions of steroids is the activation of the tyrosine kinase molecule Src pathway, through which ERs and PRs interact within cells in a hormone agonist-dependent manner (Boonyaratanakornkit, Bi, Rudd, & Edwards, 2008; Edwards, Wardell, & Boonyaratanakornkit, 2002; Migliaccio et al., 1998). For example, ERs are believed to associate with Src by interaction of phosphotyrosine-537 in the ER ligand binding domain with the SH2 domain, whereas PRs, through amino acids 421 and 428 in the N-terminal, bind with the SH3 domain of Src, promoting the Src-Raf-MAPK phosphorylation cascade (Boonyaratanakornkit, Bi, Rudd, & Edwards, 2008; Lima-Hernández et al., 2012; Migliaccio et al., 1998; Varricchio et al., 2007). Alternatively, two regions within PRs were found to directly interact with ER the ER-interacting domains I and II. Thus, PRs appeared to be required for the interaction of ERs with Src, as well as the subsequent activation of MAPK. This mechanism could explain why female rats whose PR expression has been suppressed by receiving the antisense for PR do not express lordosis in response to repeated doses of EB. The involvement of this ER-PR-Src trimer on the regulation of lordosis is supported by our recent report (Lima-Hernández et al., 2012) in which lordosis induced by steroid hormones and nonsteroidal compounds, was blocked by the specific Src kinase inhibitor PP2 (Li et al., 2006). This is supported further by the finding that TMX blocked the lordosis induced by agents with different chemical structures that do not bind directly to ERs, as well as the finding that the pure ER antagonist, ICI182780, also blocked P- and GnRH-induced estrous behavior (Lima-Hernández et al., 2014).

In summary, although it is possible that free E_2 elicits significant lordosis behavior in estrogen-primed rats by interacting with PRs, as well as by activating ERs, our results suggest that this effect appears to be dependent on the concentration of EB the female receives during the priming period. However, further studies are required to determine the specific cellular mechanism used by free E_2 in the display of female estrous behavior in EB-primed rats.

References

- Amat, P., Pastor, F. E., Blazquez, J. L., Pelaez, B., Sanchez, A., Alvarez-Monjo, A. J., . . . Amat-Peral, G. (1999). Lateral evaginations from the third ventricle into the rat mediobasal hypothalamus: An amplification of the ventricular route. *Neuroscience*, 88, 673–677. [http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00470-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00470-9)
- Auger, A. P., Moffatt, C. A., & Blaustein, J. D. (1997). Progesterone-independent activation of rat brain progesterin receptors by reproductive stimuli. *Endocrinology*, 138, 511–514. <http://dx.doi.org/10.1210/endo.138.1.4986>
- Battal, B., Kocaoglu, M., Bulakbasi, N., Husmen, G., Tuba Sanal, H., & Tayfun, C. (2011). Cerebrospinal fluid flow imaging by using phase-contrast MR technique. *The British Journal of Radiology*, 84, 758–765. <http://dx.doi.org/10.1259/bjr/66206791>
- Beach, F. A., Etkin, W., & Rasquin, P. (1942). Importance of progesterone to induction of sexual receptivity in spayed female rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 51, 369–371. <http://dx.doi.org/10.3181/00379727-51-13979>
- Beyer, C., González-Flores, O., García-Juárez, M., & González-Mariscal, G. (2003). Non-ligand activation of estrous behavior in rodents: Cross-talk at the progesterone receptor. *Scandinavian Journal of Psychology*, 44, 221–229. <http://dx.doi.org/10.1111/1467-9450.00339>
- Beyer, C., González-Flores, O., & González-Mariscal, G. (1995). Ring A reduced progestins potently stimulate estrous behavior in rats: Paradoxical effect through the progesterone receptor. *Physiology & Behavior*, 58, 985–993. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384\(95\)00141-5](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384(95)00141-5)
- Beyer, C., González-Flores, O., & González-Mariscal, G. (1997). Progesterone receptor participates in the stimulatory effect of LHRH, prostaglandin E2, and cyclic AMP on lordosis and preceptive behaviours in rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 9, 609–614. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2826.1997.00617.x>
- Beyer, C., Morali, G., & Vargas, R. (1971). Effect of diverse estrogens on estrous behavior and genital tract development in ovariectomized rats. *Hormones and Behavior*, 2, 273–277. [http://dx.doi.org/10.1016/0018-506X\(71\)90001-8](http://dx.doi.org/10.1016/0018-506X(71)90001-8)
- Bixo, M., Bäckström, T., Winblad, B., Selstam, G., & Andersson, A. (1986). Comparison between pre- and postovulatory distributions of oestradiol and progesterone in the brain of the PMSG-treated rat. *Acta Physiologica Scandinavica*, 128, 241–246. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-1716.1986.tb07972.x>
- Blaustein, J. D., Dudley, S. D., Gray, J. M., Roy, E. J., & Wade, G. N. (1979). Long-term retention of estradiol by brain cell nuclei and female rat sexual behavior. *Brain Research*, 173, 355–359. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90637-1](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(79)90637-1)
- Blaustein, J. D., & Feder, H. H. (1979). Cytoplasmic progesterin-receptors in guinea pig brain: Characteristics and relationship to the induction of sexual behavior. *Brain Research*, 169, 481–497. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90398-6](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(79)90398-6)
- Blaustein, J. D., Finkbohner, R., & Delville, Y. (1987). Estrogen-induced and estrogen-facilitated female rat sexual behavior is not mediated by progesterin receptors. *Neuroendocrinology*, 45, 152–159. <http://dx.doi.org/10.1159/000124717>
- Boling, J. M., & Blandau, R. (1939). The estrogen-progesterone induction of mating response in the spayed female rat. *Endocrinology*, 25, 359–364. <http://dx.doi.org/10.1210/endo-25-3-359>
- Boonyaratanakornkit, V., Bi, Y., Rudd, M., & Edwards, D. P. (2008). The role and mechanism of progesterone receptor activation of extra-nuclear signaling pathways in regulating gene transcription and cell cycle progression. *Steroids*, 73, 922–928. <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2008.01.010>
- Butcher, R. L., Collins, W. E., & Fugo, N. W. (1974). Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 β throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology*, 94, 1704–1708. <http://dx.doi.org/10.1210/endo-94-6-1704>
- Camacho-Arroyo, I., Guerra-Araiza, C., & Cerbón, M. A. (1998). Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *Neuroreport*, 9, 3993–3996. <http://dx.doi.org/10.1097/00001756-199812210-00001>
- Chazal, G., Faudon, M., Gogan, F., & Rotsztein, W. (1975). Effects of two estradiol antagonists upon the estradiol uptake in the rat brain and peripheral tissues. *Brain Research*, 89, 245–254. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(75\)90716-7](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(75)90716-7)
- Davidson, J. M., Rodgers, C. H., Smith, E. R., & Bloch, G. J. (1968). Stimulation of female sex behavior in adrenalectomized rats with estrogen alone. *Endocrinology*, 82, 193–195. <http://dx.doi.org/10.1210/endo-82-1-193>
- Da Vies, P., Syne, J. S., & Nicholson, R. I. (1979). Effects of estradiol and the antiestrogen tamoxifen on steroid hormone receptor concentration and nuclear ribonucleic acid polymerase activities in rat uteri. *Endocrinology*, 105, 1336–1342. <http://dx.doi.org/10.1210/endo-105-6-1336>
- Eaton, G. G., Goy, R. W., & Resko, J. A. (1975). Brain uptake and metabolism of estradiol benzoate and estrous behavior in ovariectomized guinea pigs. *Hormones and Behavior*, 6, 81–97. [http://dx.doi.org/10.1016/0018-506X\(75\)90025-2](http://dx.doi.org/10.1016/0018-506X(75)90025-2)

- Edwards, D. P., Wardell, S. E., & Boonyaratanakomkit, V. (2002). Progesterone receptor interacting coregulatory proteins and cross talk with cell signaling pathways. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *83*, 173–186. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-0760\(02\)00265-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-0760(02)00265-0)
- Edwards, D. A., Whalen, R. E., & Nadler, R. D. (1968). Induction of estrus: Estrogen-progesterone interactions. *Physiology & Behavior*, *3*, 29–33. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384\(68\)90027-9](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384(68)90027-9)
- Etgen, A. M. (1979). Antiestrogens: Effects of tamoxifen, nafoxidine, and CI-628 on sexual behavior, cytoplasmic receptors, and nuclear binding of estrogen. *Hormones and Behavior*, *13*, 97–112. [http://dx.doi.org/10.1016/0018-506X\(79\)90050-3](http://dx.doi.org/10.1016/0018-506X(79)90050-3)
- Etgen, A. M., & Shamamian, P. (1986). Regulation of estrogen-stimulated lordosis behavior and hypothalamic progesterin receptor induction by antiestrogens in female rats. *Hormones and Behavior*, *20*, 166–180. [http://dx.doi.org/10.1016/0018-506X\(86\)90015-2](http://dx.doi.org/10.1016/0018-506X(86)90015-2)
- Fadem, B. H., Barfield, R. J., & Whalen, R. E. (1979). Dose-response and time-response relationships between progesterone and the display of patterns of receptive and proceptive behavior in the female rat. *Hormones and Behavior*, *13*, 40–48. [http://dx.doi.org/10.1016/0018-506X\(79\)90033-3](http://dx.doi.org/10.1016/0018-506X(79)90033-3)
- Feder, H. R., & Morin, L. P. (1974). Suppression of lordosis in guinea pigs by ethamoxy-triphetol (MER-25) given at long intervals (34–46 hr) after estradiol benzoate treatment. *Hormones and Behavior*, *5*, 63–71. [http://dx.doi.org/10.1016/0018-506X\(74\)90007-5](http://dx.doi.org/10.1016/0018-506X(74)90007-5)
- García-Juárez, M., Beyer, C., Soto-Sánchez, A., Domínguez-Ordoñez, R., Gómora-Arrati, P., Lima-Hernández, F. J., . . . González-Flores, O. (2011). Leptin facilitates lordosis behavior through GnRH-I and progesterin receptors in estrogen-primed rats. *Neuropeptides*, *45*, 63–67. <http://dx.doi.org/10.1016/j.npep.2010.11.001>
- González-Mariscal, G., González-Flores, O., & Beyer, C. (1989). Intrahypothalamic injection of RU486 antagonizes the lordosis induced by ring A-reduced progestins. *Physiology & Behavior*, *46*, 435–438. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384\(89\)90016-4](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384(89)90016-4)
- Guerra-Araiza, C., Gómora-Arrati, P., García-Juárez, M., Armengual-Villegas, A., Miranda-Martínez, A., Lima-Hernández, F. J., . . . González-Flores, O. (2009). Role of progesterone receptor isoforms in female sexual behavior induced by progestins in rats. *Neuroendocrinology*, *90*, 73–81. <http://dx.doi.org/10.1159/000224406>
- Guerra-Araiza, C., Villamar-Cruz, O., González-Arenas, A., Chavira, R., & Camacho-Arroyo, I. (2003). Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after estradiol and progesterone treatments. *Journal of Neuroendocrinology*, *15*, 984–990. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.01088.x>
- Hardy, D. F., & DeBold, J. F. (1971). The relationship between levels of exogenous hormones and the display of lordosis by the female rat. *Hormones and Behavior*, *2*, 287–297. [http://dx.doi.org/10.1016/0018-506X\(71\)90003-1](http://dx.doi.org/10.1016/0018-506X(71)90003-1)
- Hasan, T. N., Leena, G. B., Masoodi, T. A., Shafi, G., Alshatwi, A. A., & Sivasubramanian, P. (2011). Affinity of estrogens for human progesterone receptor A and B monomers and risk of breast cancer: A comparative molecular modeling study. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*, *4*, 29–36. <http://dx.doi.org/10.2147/AABC.S17371>
- Howard, S. B., Etgen, A. M., & Barfield, R. J. (1984). Antagonism of central estrogen action by intracerebral implants of tamoxifen. *Hormones and Behavior*, *18*, 256–266. [http://dx.doi.org/10.1016/0018-506X\(84\)90015-1](http://dx.doi.org/10.1016/0018-506X(84)90015-1)
- Jones, S. L., Farrell, S., Gregory, J. G., & Pfau, J. G. (2013). Sensitization of sexual behavior in ovariectomized rats by chronic estradiol treatment. *Hormones and Behavior*, *64*, 8–18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.04.012>
- Jones, S. L., & Pfau, J. G. (2014). Sensitization of sexual behaviors in ovariectomized Long-Evans rats is induced by a subthreshold dose of estradiol benzoate and attenuated by repeated copulation. *Hormones and Behavior*, *66*, 655–662. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.09.009>
- Jordan, V. C., Dix, C. J., Rowsby, L., & Prestwich, G. (1977). Studies on the mechanism of action of the nonsteroidal antioestrogen tamoxifen (I. C. I. 46,474) in the rat. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *7*, 177–192. [http://dx.doi.org/10.1016/0303-7207\(77\)90066-1](http://dx.doi.org/10.1016/0303-7207(77)90066-1)
- Koseki, Y., Zava, D. T., Chamness, G. C., & McGuire, W. L. (1977). Estrogen receptor translocation and replenishment by the antiestrogen tamoxifen. *Endocrinology*, *101*, 1104–1110. <http://dx.doi.org/10.1210/endo-101-4-1104>
- Kow, L. M., & Pfaff, D. W. (1975). Induction of lordosis in female rats: Two modes of estrogen action and the effect of adrenalectomy. *Hormones and Behavior*, *6*, 259–276. [http://dx.doi.org/10.1016/0018-506X\(75\)90013-6](http://dx.doi.org/10.1016/0018-506X(75)90013-6)
- Kudwa, A. E., & Rissman, E. F. (2003). Double oestrogen receptor alpha and beta knockout mice reveal differences in neural oestrogen-mediated progesterin receptor induction and female sexual behaviour. *Journal of Neuroendocrinology*, *15*, 978–983. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.01089.x>
- Kuhl, H. (1990). Pharmacokinetics of oestrogens and progestogens. *Maturitas*, *12*, 171–197. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-5122\(90\)90003-O](http://dx.doi.org/10.1016/0378-5122(90)90003-O)
- Kurl, R. N., & Morris, I. D. (1978). Differential depletion of cytoplasmic high affinity oestrogen receptors after the in vivo administration of the antioestrogens, clomiphene, MER-25 and tamoxifen. *British Journal of Pharmacology*, *62*, 487–493. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.1978.tb07752.x>
- Landau, I. T. (1977). Relationships between the effects of the anti-estrogen, CI-628, on sexual behavior, uterine growth, and cell nuclear estrogen retention after estradiol-17 β -benzoate administration in the ovariectomized rat. *Brain Research*, *133*, 119–138. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(77\)90053-1](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(77)90053-1)
- Li, Z., Hosoi, Y., Cai, K., Tanno, Y., Matsumoto, Y., Enomoto, A., . . . Miyagawa, K. (2006). Src tyrosine kinase inhibitor PP2 suppresses ERK1/2 activation and epidermal growth factor receptor transactivation by X-irradiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *341*, 363–368. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.193>
- Lima-Hernández, F. J., Beyer, C., Gómora-Arrati, P., García-Juárez, M., Encarnación-Sánchez, J. L., Etgen, A. M., & González-Flores, O. (2012). Src kinase signaling mediates estrous behavior induced by 5 β -reduced progestins, GnRH, prostaglandin E2 and vaginocervical stimulation in estrogen-primed rats. *Hormones and Behavior*, *62*, 579–584. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.09.004>
- Lima-Hernández, F. J., Gómora-Arrati, P., García-Juárez, M., Blaustein, J. D., Etgen, A. M., Beyer, C., & González-Flores, O. (2014). Estrogen receptors regulate the estrous behavior induced by progestins, peptides, and prostaglandin E2. *Hormones and Behavior*, *66*, 361–368. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.06.011>
- Lisk, R. D. (1962). Diencephalic placement of estradiol and sexual receptivity in the female rat. *American Journal of Physiology*, *203*, 493–496. <http://www.physiology.org/>
- MacLusky, N. J., & McEwen, B. S. (1978). Oestrogen modulates progesterin receptor concentrations in some rat brain regions but not in others. *Nature*, *274*, 276–278. <http://dx.doi.org/10.1038/274276a0>
- Mani, S. K., Allen, J. M., Clark, J. H., Blaustein, J. D., & O'Malley, B. W. (1994). Convergent pathways for steroid hormone- and neurotransmitter-induced rat sexual behavior. *Science*, *265*, 1246–1249. <http://dx.doi.org/10.1126/science.7915049>
- Mani, S. K., & Blaustein, J. D. (2012). Neural progesterin receptors and female sexual behavior. *Neuroendocrinology*, *96*, 152–161. <http://dx.doi.org/10.1159/000338668>
- McEwen, B. S., Pfaff, D. W., Chaptal, C., & Luine, V. N. (1975). Brain cell nuclear retention of [3 H]estradiol doses able to promote lordosis: Temporal and regional aspects. *Brain Research*, *86*, 155–161. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(75\)90649-6](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(75)90649-6)

- McKenna, S. E., Simon, N. G., & Cologer-Clifford, A. (1992). An assessment of agonist/antagonist effects of tamoxifen in the female mouse brain. *Hormones and Behavior*, 26, 536–544. [http://dx.doi.org/10.1016/0018-506X\(92\)90020-V](http://dx.doi.org/10.1016/0018-506X(92)90020-V)
- Micevych, P., Soma, K. K., & Sinchak, K. (2008). Neuroprogesterone: Key to estrogen positive feedback? *Brain Research Reviews*, 57, 470–480. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.06.009>
- Migliaccio, A., Piccolo, D., Castoria, G., Di Domenico, M., Bilancio, A., Lombardi, M., . . . Auricchio, F. (1998). Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *The EMBO Journal*, 17, 2008–2018. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/17.7.2008>
- Moralí, G., & Beyer, C. (1979). Neuroendocrine control of mammalian estrous behavior. In C. Beyer (Ed.), *Endocrine control of sexual behavior* (pp. 33–75). New York, NY: Raven Press.
- Neckers, L., & Whitesell, L. (1993). Antisense technology: Biological utility and practical considerations. *The American Journal of Physiology*, 265, L1–L12.
- Ogawa, S., Eng, V., Taylor, J., Lubahn, D. B., Korach, K. S., & Pfaff, D. W. (1998). Roles of estrogen receptor- α gene expression in reproduction-related behaviors in female mice. *Endocrinology*, 139, 5070–5081. <http://dx.doi.org/10.1210/endo.139.12.6357>
- Parsons, B., MacLusky, N. J., Krey, L., Pfaff, D. W., & McEwen, B. S. (1980). The temporal relationship between estrogen-inducible progesterin receptors in the female rat brain and the time course of estrogen activation of mating behavior. *Endocrinology*, 107, 774–779. <http://dx.doi.org/10.1210/endo-107-3-774>
- Parsons, B., Rainbow, T. C., Snyder, L., & McEwen, B. S. (1984). Progesterone-like effects of estradiol on reproductive behavior and hypothalamic progesterin receptors in the female rat. *Neuroendocrinology*, 39, 25–30. <http://dx.doi.org/10.1159/000123950>
- Paxinos, G., & Watson, C. (2006). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney, Australia: Academic Press.
- Pfaff, D. W., & Sakuma, Y. (1979). Deficit in the lordosis reflex of female rats caused by lesions in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *The Journal of Physiology*, 288, 203–210.
- Powers, B., & Valenstein, E. S. (1972). Sexual receptivity: Facilitation by medial preoptic lesions in female rats. *Science*, 175, 1003–1005. <http://dx.doi.org/10.1126/science.175.4025.1003>
- Ramírez-Orduña, J. M., Lima-Hernández, F. J., García-Juárez, M., González-Flores, O., & Beyer, C. (2007). Lordosis facilitation by LHRH, PGE2 or db-cAMP requires activation of the kinase A signaling pathway in estrogen primed rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 86, 169–175. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2006.12.022>
- Roy, E. J., & Wade, G. N. (1977). Binding of [3-HR]estradiol by brain cell nuclei and female rat sexual behavior: Inhibition by antiestrogens. *Brain Research*, 126, 73–87. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(77\)90216-5](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(77)90216-5)
- Siegel, S., & Castellan, N. J. (1995). *Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta*. México: Trillas. ISBN 10: 9682451019
- Singer, J. J. (1968). Hypothalamic control of male and female sexual behavior in female rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 66, 738–742. <http://dx.doi.org/10.1037/h0026519>
- Szklarczyk, A., & Kaczmarek, L. (1995). Antisense oligodeoxynucleotides: Stability and distribution after intracerebral injection into rat brain. *Journal of Neuroscience Methods*, 60, 181–187. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270\(95\)00010-R](http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270(95)00010-R)
- Varricchio, L., Migliaccio, A., Castoria, G., Yamaguchi, H., de Falco, A., Di Domenico, M., . . . Auricchio, F. (2007). Inhibition of estradiol receptor/Src association and cell growth by an estradiol receptor alpha tyrosine-phosphorylated peptide. *Molecular Cancer Research*, 5, 1213–1221. <http://dx.doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-0150>
- Wade, G. N., & Blaustein, J. D. (1978). Effects of an anti-estrogen on neural estradiol binding and on behaviors in female rats. *Endocrinology*, 102, 245–251. <http://dx.doi.org/10.1210/endo-102-1-245>
- Whalen, R. E. (1974). Estrogen-progesterone induction of mating in female rats. *Hormones and Behavior*, 5, 157–162. [http://dx.doi.org/10.1016/0018-506X\(74\)90040-3](http://dx.doi.org/10.1016/0018-506X(74)90040-3)
- Yanase, M., & Gorski, R. A. (1976). Sites of estrogen and progesterone facilitation of lordosis behavior in the spayed rat. *Biology of Reproduction*, 15, 536–543. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod15.4.536>
- Yoshinaga, K., Hawkins, R. A., & Stocker, J. F. (1969). Estrogen secretion by the rat ovary *in vivo* during the estrous cycle and pregnancy. *Endocrinology*, 85, 103–112. <http://dx.doi.org/10.1210/endo-85-1-103>
- Zemlan, F. P., & Adler, N. T. (1977). Hormonal control of female sexual behavior in the rat. *Hormones and Behavior*, 9, 345–357. [http://dx.doi.org/10.1016/0018-506X\(77\)90069-1](http://dx.doi.org/10.1016/0018-506X(77)90069-1)

Received May 21, 2015

Revision received July 16, 2015

Accepted August 31, 2015 ■

14.2. Estrogen receptor α and β are involved in the activation of lordosis behavior in estradiol-primed rats. *Hormones and Behavior*. 2016.

Hormones and Behavior 86 (2016) 1–7



Contents lists available at ScienceDirect

Hormones and Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yhbeh



Estrogen receptor α and β are involved in the activation of lordosis behavior in estradiol-primed rats



Raymundo Domínguez-Ordóñez^{a,b}, Marcos García-Juárez^a, Francisco J. Lima-Hernández^{a,c}, Porfirio Gómora-Arrati^a, Jeffrey D. Blaustein^d, Anne M. Etgen^e, Oscar González-Flores^{a,*}

^a Centro de Investigación en Reproducción Animal, Universidad Autónoma de Tlaxcala-CINVESTAV, México

^b Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México

^c Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Tlaxcala, México

^d Department of Psychological and Brain Sciences, University of Massachusetts, Amherst, MA 01003, USA

^e Department of Neuroscience, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY 10461, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 May 2016

Revised 28 August 2016

Accepted 31 August 2016

Available online 01 September 2016

Keywords:

Estrogen receptor isoforms

Estradiol

Progesterone receptor

Lordosis

ABSTRACT

The present study was designed to assess the participation of estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β) in the short-term facilitation of lordosis behavior in ovariectomized (ovx), estradiol (E₂) primed rats. In experiment 1, dose response curves for PPT and DPN (ER α and ER β agonists, respectively) facilitation of lordosis behavior (lordosis quotient and lordosis score) were established by infusing these agonists into the right lateral ventricle (icv) in female rats injected 40 h previously with 5 μ g of E₂ benzoate. PPT doses of 0.08 and 0.4 ng produced high lordosis quotients starting at 30 min and continuing at 120 and 240 min post-injection. DPN induced high levels of lordosis behavior at all times tested. However, the intensity of lordosis induced by both agonists was weak. In experiment 2, we tested the involvement of each ER in facilitation of lordosis by icv infusion of MPP (ER α -selective antagonist) or PHTPP (ER β -selective antagonist) prior to infusion of 2 ng of free E₂. Icv infusion of either MPP or PHTPP 30 min before free E₂ significantly depressed E₂ facilitation of lordosis. The results suggest that both forms of ER are involved in the short-latency facilitation of lordosis behavior in E₂-primed rats.

© 2016 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

In species with short periods of estrus, such as rats and mice, estrogens and progesterone (P) are required to trigger and to regulate the duration of estrous behavior (lordosis and proceptivity). However, other hormones or neuromodulators with different chemical structures, such as ring A-reduced progestins, gonadotropin releasing hormone (GnRH), prostaglandin E₂ (PGE₂), dopamine, and leptin, also elicit lordosis in estrogen-primed rats with a latency similar to P (Beyer et al., 1997; García-Juárez et al., 2013; González-Mariscal et al., 1993; Kow and Pfaff, 2004; Lima-Hernández et al., 2012; Mani et al., 1994; Mani et al., 1996; Ramírez-Orduña et al., 2007; Rodríguez-Sierra and Komisaruk, 1978).

Estradiol (E₂), administered intraperitoneally, intravenously, subcutaneously (sc) or infused directly into the brain also facilitates lordosis behavior independent of P (Arai and Gorski, 1968; Domínguez-Ordóñez et al., 2015; Green et al., 1970; Harris and Michael, 1964; Lisk, 1962; Ross et al., 1971). For example, when ovariectomized (ovx), adrenalectomized (to eliminate peripheral sources of P) female

rats are exposed continuously to E₂ for an extended period of time (e.g., injected with low doses for several days (Beyer et al., 1971; Davidson et al., 1968; Edwards et al., 1968) or when they receive a single injection of a high dose of E₂, lordosis behavior is activated in the absence of P (Zemlan and Adler, 1977).

The cellular mechanisms underlying lordosis behavior facilitated by E₂ in estrogen-primed rats are not fully known. One possibility is that classical estrogen receptors (ERs) mediate E₂-facilitated lordosis (Blaustein and Erskine, 2002; Blaustein and Olster, 1989; Dewing et al., 2007). This idea is supported by the ability of the ER antagonist, tamoxifen, significantly to attenuate estrous behavior induced by several agents in estrogen-treated rats (Domínguez-Ordóñez et al., 2015; Etgen, 1979; Lima-Hernández et al., 2014; Roy and Wade, 1977).

Two classical subtypes of ERs, ER α and ER β , with high sequence homology and equal affinity for E₂, are expressed in brain areas involved in expression of estrous behavior, such as the ventromedial hypothalamus and the medial preoptic area, often in the same cells. In addition, ERs that are localized in the cell membrane and that can be activated by estrogens have been described (Greco et al., 2001, 2003; Ikeda et al., 2003; Kuiper et al., 1997; Simerly and Young, 1991; Shughrue et al., 1996, 1997, 1998; Shughrue and Merchenthaler, 2001), such as G-protein coupled estrogen receptor 1 (GPER-1), which play an important role in mediating the rapid effects of E₂.

* Corresponding author at: Centro de Investigación en Reproducción Animal, Apartado Postal # 62, Tlaxcala 90000, México.

E-mail address: oglezflo@gmail.com (O. González-Flores).

The role of ER subtypes in the expression of lordosis behavior has been explored using ER knockout mice (Kudwa and Rissman, 2003; Ogawa et al., 1999; Ogawa et al., 1998; Rissman et al., 1999), antisense oligonucleotides (Walf et al., 2008) and receptor subtype-specific ligands (Dewing et al., 2007; Mazzucco et al., 2008). Results from all three approaches suggest that ER α , but not ER β , mediates the long-term priming effects of E₂ on estrous behavior. However, none of these experiments explored the short latency, triggering effect of E₂ on lordosis behavior in estrogen-primed rats.

The ability of many hormones and neurotransmitters to facilitate estrous behavior in estrogen-primed rodents with short latency (15–30 min) indicated that these agents, with different chemical structures, might have rapid effects in the central nervous system involving nongenomic mechanisms (for review see; Beyer and González-Mariscal, 1986; Beyer et al., 2003; Kow and Pfaff, 2004). Such mechanisms might also be responsible for the rapid effects of E₂ because in the cytoplasm, ERs can form several complexes with other signaling proteins to induce rapid changes in neuronal activity (Levin, 2001).

In a previous experiment, we tested the capacity of various dosages of E₂, infused icv, to stimulate estrous behaviors in estrogen-primed rats. The finding that icv E₂ significantly facilitated lordosis behavior in ovx, E₂-primed rats (Domínguez-Ordóñez et al., 2015) led us to explore the participation of ER α and ER β in this response. To accomplish this, we administered their respective agonists, PPT and DPN, icv, and assessed the length of time needed to induce the lordosis response in ovx, E₂-primed rats. In a second experiment, we tested the ability of MPP and PHTPP, ER α and ER β receptor antagonists, respectively, to interfere with the facilitating effects of E₂ on lordosis behavior.

2. Material and methods

2.1. Subjects

A total of 138 sexually inexperienced female Sprague Dawley rats (240–280 g) bred in our colony were used. They were kept at 23 ± 2 °C with an inverted light–dark cycle (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

Females were bilaterally ovx under anesthesia with xylazine (4 mg/kg) and ketamine (80 mg/kg) and housed in acrylic cages in groups of four. Two weeks later they were anesthetized with xylazine (4 mg/kg) and ketamine (80 mg/kg) and placed in a Kopf stereotaxic instrument (Tujunga, California). Animals were implanted with a stainless steel cannula (22 gauge, 17 mm long) in the right lateral ventricle (icv) following coordinates from the atlas of Paxinos and Watson (2006): A/P + 0.80 mm, M/L – 1.5 mm, D/V – 3.5 mm with respect to the bregma. A stainless steel screw was fixed to the skull and both cannula and screw were attached to the bone with dental cement. A 30 gauge insert cannula provided with a cap was introduced into the guide cannula to prevent clogging and contamination. Animal care and all the experimental procedures adhered to NIH guidelines and the Mexican Law for the Protection of Animals.

2.3. Drugs

E₂ benzoate (EB), unesterified 17- β E₂, 4,4k,4a-(4-propyl-[1H]-pyrazole-1, 3, 5-triyl) trisphenol (PPT; ER α -selective agonist) and methyl-piperidino-pyrazole (MPP; ER α -selective antagonist) were purchased from Sigma Chemical, Inc. (St. Louis, MO); 2,3-bis(4-hydroxyphenyl)-propionitrile (DPN; ER β -selective agonist) and 4-[2-phenyl-5,7 bis (trifluoromethyl)pyrazolo[1,5- α]pyrimidin-3-yl]phenol (PHTPP; ER β -selective antagonist) were purchased from Tocris Bioscience (Ellisville, MO). Individual rats were administered only one

experimental drug, although they were tested at multiple times after icv infusions.

2.4. Experiment 1

2.4.1. Effect of icv infusion of PPT and DPN on lordosis behavior of ovx, E₂-primed rats

The objective of this experiment was to assess the participation of ER α and ER β in the short-latency facilitation of lordosis behavior in E₂-primed rats. One week after icv cannulation, 98 rats were injected sc with EB (5 μ g) and 40 h later with one of the two agonists. All compounds were infused icv through a plastic catheter (Clay Adams; PE 10 No. 7401) fitted to a Hamilton syringe (10 μ l) inserted into the guide cannula. The two agonists were dissolved in DMSO (1 μ l) and dosages administered were: control DMSO, 1 μ l (n = 11); ER α agonist PPT, 0.08 ng (n = 8), 0.4 ng (n = 8), 2 ng (n = 8), 10 ng (n = 9) or 50 ng (n = 9); ER β agonist DPN 0.08 ng (n = 8), 0.4 ng (n = 10), 2 ng (n = 9), 10 ng (n = 9) or 50 ng (n = 9).

2.5. Experiment 2

2.5.1. Effect of icv infusion of MPP and PHTPP on lordosis behavior induced by E₂

One week after intracerebral implant, 40 rats received a sc injection of 5 μ g of EB, and 39.5 h later 11 animals were injected with 30 μ g of the ER α antagonist MPP, nine with 10 ng of ER β antagonist PHTPP and ten with vehicle. Thirty minutes after the administration of these drugs, i.e., 40 h post-EB, each of these animals received 2 ng of free E₂. Positive control animals (n = 10) received DMSO (antagonist vehicle) at 39.5 h and free E₂ at 40 h post-EB, while negative control animals received DMSO at 39.5 h and sesame oil (1 μ l; free E₂ vehicle) at 40 h post-EB. The doses of MPP and PHTPP chosen were based on previous in vivo studies (Dillon et al., 2013; Santollo et al., 2010). Free E₂ was dissolved at a concentration of 2 ng/1 μ l of sesame oil. This concentration was chosen based on a previous dose response curve obtained in our laboratory (Domínguez-Ordóñez et al., 2015).

2.6. Testing procedures

At 30, 120 and 240 min after E₂ or ER agonist administration, EB-primed females were placed in a circular Plexiglas arena (53 cm in diameter) with a sexually experienced male until they received 10 vigorous mounts with clear pelvic thrusting. 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) of Hardy and DeBold (1972). This scale ranged from 0 to 3 for each individual response and consequently, from 0 to 30 for each female that received 10 mounts. Proceptive behaviors were not evaluated because very few rats displayed darting, hopping or ear-wiggling following ER agonist administration.

2.7. Histological study

Twenty-four hours after completion of the experiments, rats were anesthetized with halothane, and 1% methylene blue was administered through the cannula. They were then euthanized with an overdose of the anesthetic. The brain was removed and sectioned in the transverse plane to verify the cannula position in the right lateral ventricle. Those animals with the cannula outside the ventricle were discarded from the experiment.

2.8. Statistical analysis

To assess the effect of PPT and DPN versus vehicle in the first experiment, we used first the Kruskal–Wallis test (significance level ***p < 0.001) for each of the three times tested. Subsequently, the results

obtained at 30, 120 and 240 min were compared using the Mann–Whitney test (significance level *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$). The effects of ER α (MPP) and ER β (PHTPP) antagonists on the behavioral actions of E $_2$ in experiment 2 were assessed by comparing the LQs obtained with E $_2$ alone versus those obtained when antagonists were added (significance level **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$). Because the distribution of LQ values in those groups were not normal, a Wilcoxon–Mann–Whitney test was used to compare two independent groups (Bruning and Kintz, 1987). This test is an excellent alternative to the t -test with a power efficiency of 95.5% of the parametric test (Bruning and Kintz, 1987).

3. Results

3.1. Experiment 1

3.1.1. PPT induces lordosis behavior in EB-primed rats

As shown in Fig. 1A, the Kruskal–Wallis test showed that infusion of the ER α agonist PPT significantly elevated LQs relative to vehicle controls at all three times tested (30 min, $K = 27.2$; 120 min, $K = 32.7$; 240 min, $K = 23.0$; $df = 5$ and $p < 0.001$ at all times). Fig. 1B shows that PPT had similar effects on LS (30 min, $K = 26.7$; 120 min, $K = 27.1$; 240 min, $K = 19.1$; $df = 5$ and $p < 0.001$ at all times).

Because the overall effects of PPT on LQs were statistically significant, we next compared the independent groups given different doses

using the Mann–Whitney U test. At 30 min all doses except 10 ng significantly elevated lordosis when compared to DMSO-infused controls (0.08 ng, $U = 4$, $p < 0.001$; 0.4 ng, $U = 7$, $p < 0.001$; 2 ng, $U = 11.5$, $p < 0.01$; 50 ng, $U = 24.5$, $p < 0.05$; $df = 1$ in all cases). At 120 and 240 min, all doses of PPT significantly increased LQs relative to vehicle controls (120 min: 0.08 ng, $U = 6$, $p < 0.001$; 0.4 ng, $U = 12.5$, $p < 0.01$; 2 ng, $U = 1.5$, $p < 0.001$; 10 ng, $U = 14$, $p < 0.01$; 50 ng, $U = 18.5$, $p < 0.05$; 240 min: 0.08 ng, $U = 9$, $p < 0.01$; 0.4 ng, $U = 17.5$, $p < 0.05$; 2 ng, $U = 6.5$, $p < 0.01$; 10 ng, $U = 16.5$, $p < 0.05$; 50 ng, $U = 21.5$, $p < 0.05$; $df = 1$ in all cases) (Fig. 1A). The same pattern was found for LS values (Fig. 1B) in PPT-treated females. All but the 10 ng dose of PPT significantly increase LS at 30 min (0.08 ng, $U = 4$, $p < 0.001$; 0.4 ng, $U = 8$, $p < 0.01$; 2 ng, $U = 10$, $p < 0.01$; 50 ng, $U = 25$, $p < 0.05$; $df = 1$ in all cases). All doses were effective in significantly elevating LS scores at 120 and 240 min compared to vehicle controls (120 min: 0.08 ng, $U = 5$, $p < 0.001$; 0.4 ng, $U = 10$, $p < 0.01$; 2 ng, $U = 0.05$, $p < 0.001$; 10 ng, $U = 10.5$, $p < 0.01$; 50 ng, $U = 17$, $p < 0.05$; 240 min: 0.08 ng, $U = 11$, $p < 0.01$; 0.4 ng, $U = 19.5$, $p < 0.05$; 2 ng, $U = 7.5$, $p < 0.01$; 10 ng, $U = 19$, $p < 0.05$; 50 ng, $U = 25$, $p < 0.05$; $df = 1$ in all cases).

3.1.2. DPN induces lordosis behavior in EB-primed rats

As shown in Fig. 2A, the Kruskal–Wallis test showed that infusion of the ER β agonist DPN significantly increased LQ relative to DMSO (control) at all three times tested (30 min, $K = 27.2$; 120 min, $K = 32.7$;

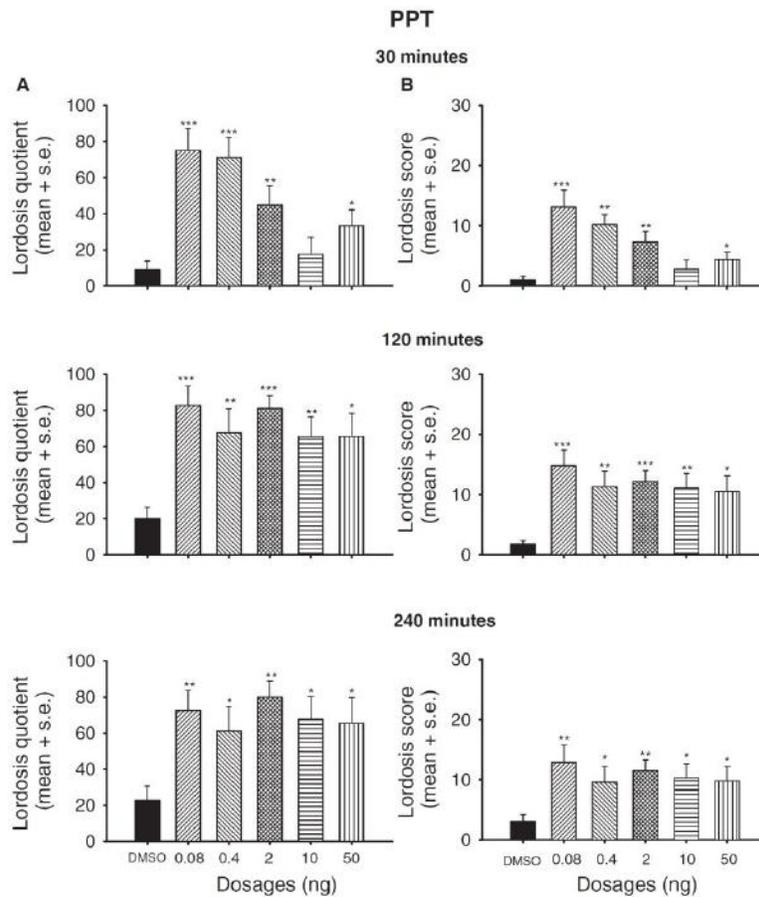


Fig. 1. Effect of the icv injection of several doses of ER α agonist PPT; 0.08 ng ($n = 8$), 0.4 ng ($n = 8$), 2 ng ($n = 8$), 10 ng ($n = 9$), 50 ng ($n = 9$) or DMSO ($n = 11$) to ovx, E $_2$ -primed rats on: lordosis quotient (LQ; panel A) and lordosis score (LS; panel B). Females were tested at 30, 120, and 240 min after PPT or DMSO injection. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs DMSO.

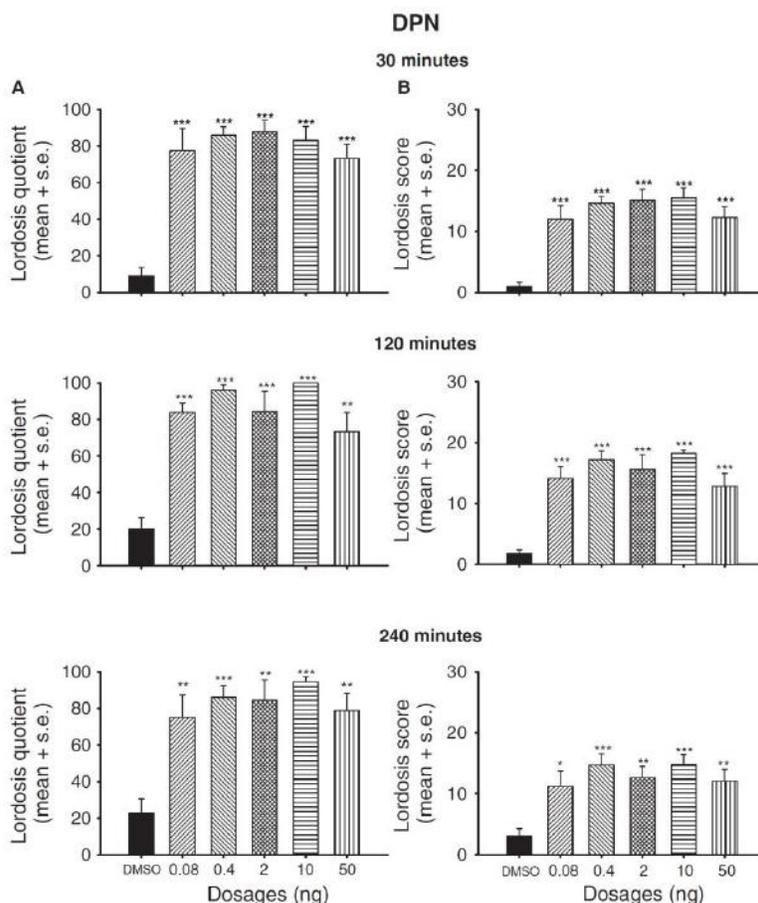


Fig. 2. Effect of the icv injection of ER β agonist DPN; 0.08 ng ($n = 8$), 0.4 ng ($n = 10$), 2 ng ($n = 9$), 10 ng ($n = 9$), 50 ng ($n = 9$) or DMSO ($n = 11$) to ovx, E $_2$ -primed rats on: lordosis quotient (LQ; panel A) and lordosis score (LS; panel B). Females were tested at 30, 120, and 240 min after injection of DPN or DMSO. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs DMSO.

240 min, $K = 23.01$; $df = 5$, $p < 0.001$ at all times). Fig. 2B shows that DPN had similar effects on LS (30 min, $K = 26.7$; 120 min, $K = 27.1$; 240 min, $K = 19.1$; $df = 5$, $p < 0.001$ at all times).

Because the overall effects of DPN on LQs were statistically significant, we next compared the independent groups given different doses using the Mann Whitney U test. At 30 min all doses significantly elevated lordosis when compared to vehicle-infused controls (0.08 ng, $U = 4$; 0.4 ng, $U = 0.5$; 2 ng, $U = 0.05$; 10, $U = 1$ and 50 ng, $U = 2$; $df = 1$, $p < 0.001$ in all cases). At 120 min and 240 min all doses of DPN significantly increased LQs relative to DMSO (120 min: 0.08 ng, $U = 0.5$; 0.4 ng, $U = 0.001$; 2 ng, $U = 8.5$; 10 ng, $U = 0.001$, $df = 1$, $p < 0.001$ for those doses and 50 ng, $U = 9$, $df = 1$, $p < 0.01$; 240 min: 0.08 ng, $U = 12$, $p < 0.01$; 0.4 ng, $U = 5$, $p < 0.001$; 2 ng, $U = 9.5$, $p < 0.01$; 10 ng, $U = 1$, $p < 0.001$ and 50 ng, $U = 8.5$, $p < 0.01$; $df = 1$) (Fig. 2A). The same pattern was found for LS values (Fig. 2B) in DPN-treated animals. All doses of DPN significantly increased LS at 30 min (0.08 ng, $U = 3$; 0.4 ng, $U = 0.5$; 2 ng, $U = 0.001$; 10 ng, $U = 0.001$ and 50 ng, $U = 2$; $df = 1$ and $p < 0.001$ in all cases), at 120 min (0.08 ng, $U = 0.5$; 0.4 ng, $U = 0.001$; 2 ng, $U = 8$; 10 ng, $U = 0.001$ and 50 ng, $U = 2.5$; $df = 1$ and $p < 0.001$ in all cases) and at 240 min (0.08 ng, $U = 14.5$, $p < 0.05$; 0.4 ng, $U = 6.5$, $p < 0.001$; 2 ng, $U = 10.5$, $p < 0.01$; 10 ng, $U = 4$, $p < 0.001$ and 50 ng, $U = 10$, $p < 0.01$; $df = 1$).

Comparisons between the PPT (Fig. 1), DPN (Fig. 2) and free E $_2$ (Fig. 3), given at the same dose (2 ng), show that they are equally effective at

all times, with one exception, DPN at 30 min was significantly more effective than free E $_2$ in facilitating lordosis ($p < 0.001$).

3.2. Experiment 2

3.2.1. Effects of MPP and PHTPP on lordosis behavior induced by free E $_2$ in EB-primed rats

As shown in Fig. 3A, estrogen-primed animals infused only with free E $_2$ exhibited clearly elevated LQ scores at 30 ($U = 20.5$, $df = 1$, $p < 0.01$), 120 ($U = 10$, $df = 1$, $p < 0.001$) and 240 min ($U = 22$, $df = 1$, $p < 0.05$) when compared with controls. Animals receiving infusions of the ER α antagonist MPP prior to free E $_2$ exhibited significantly less lordosis at 120 min ($U = 93$, $df = 1$, $p < 0.01$ vs free E $_2$). However, at 30 and 240 min, the effects of MPP were not statistically significant. LS induced by free E $_2$ alone (Fig. 3B) was significantly higher than in vehicle controls at 30 ($U = 20$, $df = 1$, $p < 0.01$), 120 ($U = 8.5$, $df = 1$, $p < 0.001$) and 240 min ($U = 21.5$, $df = 1$, $p < 0.05$). MPP significantly reduced the E $_2$ -induced elevation of LS at 120 ($U = 91.5$, $df = 1$, $p < 0.01$) and 240 min ($U = 83.5$, $df = 1$, $p < 0.05$).

Fig. 4A shows that the ER β antagonist PHTPP also significantly reduced LQ in rats infused with E $_2$ at 120 ($U = 82$, $df = 1$, $p < 0.01$) and 240 min ($U = 84$, $df = 1$, $p < 0.001$). Fig. 4B shows that the increase in LS induced by E $_2$ was also reduced by PHTPP at 120 ($U = 83$, $df = 1$, $p < 0.01$) and 240 min ($U = 84$, $df = 1$, $p < 0.001$).

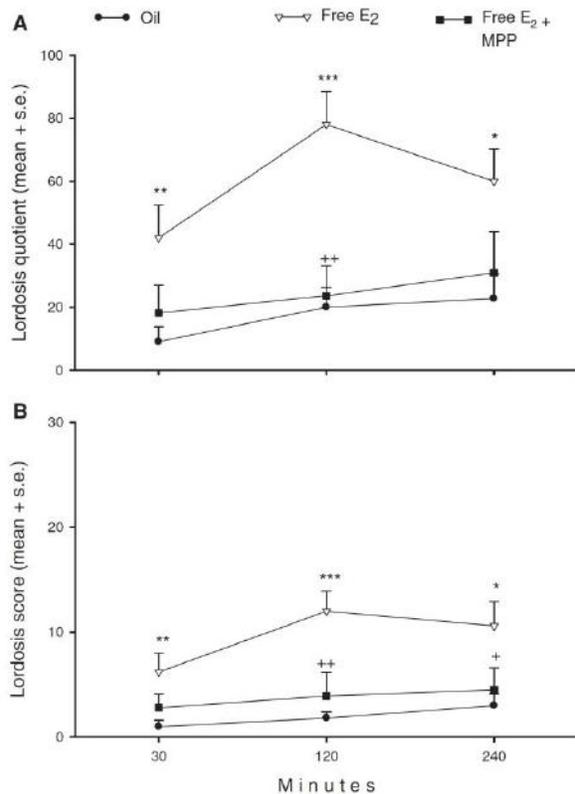


Fig. 3. Facilitation of lordosis in ovx, E₂ primed rats at 30, 120 and 240 min after icv infusion of 2 ng (n = 10) of free E₂ or its vehicle (n = 10). ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 vs vehicle. The facilitation of lordosis produced by free E₂ was antagonized by icv infusion of 30 μg of the ERα antagonist MPP (n = 11). ++p < 0.01, +p < 0.05 vs free E₂.

4. Discussion

The aim of the present study was to investigate the participation of classical ER isoforms in short latency facilitation of the lordosis response in ovx, E₂-primed rats. The results show that activation of ERα by its agonist PPT and of ERβ by its agonist DPN induced intense lordosis behavior. Moreover, selective antagonists of ERα (MPP) and ERβ (PHTPP) significantly reduced lordosis behavior induced by the icv administration of 2 ng of free E₂. These findings are in agreement with previous data (Ross et al., 1971) showing that E₂ implanted in the caudal mesencephalic reticular formation and medial preoptic area of ovx, E₂-primed rats significantly increased lordosis behavior. Moreover, we recently demonstrated that sc and icv administration of free E₂ triggered intense lordosis behavior in female rats pretreated with EB, in the absence of P (Domínguez-Ordóñez et al., 2015). In addition, concurrent icv administration of tamoxifen (a non-selective ER modulator) attenuated estrous behavior (lordosis and proceptivity) induced by several progestins and by agents including GnRH, leptin and PGE₂ (Lima-Hernández et al., 2014). These results agree with previous reports (Blaustein et al., 1979; Blaustein and Wade, 1977) that P-induced lordosis behavior in E₂-primed guinea pigs and rats was prevented by ER antagonist administration near the time of P injection. Thus, ERs are activated by free-E₂, PPT, and DPN many hour after the priming injection of E₂, and they may be required to induce maximum levels of female sexual receptivity (see; Kow and Pfaff, 1975; Kow and Pfaff, 1998; Micevych and Dewing, 2011; Micevych and Sinchak, 2013).

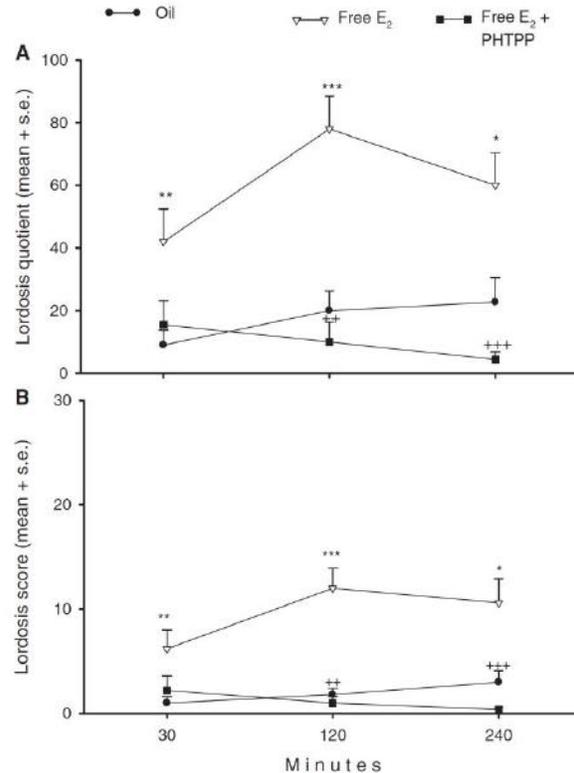


Fig. 4. Facilitation of lordosis in ovx, E₂ primed rats at 30, 120 and 240 min after the icv infusion of 2 ng (n = 10) of free E₂ or its vehicle (n = 10). ***p < 0.001; **p < 0.01; *p < 0.05 vs vehicle. The facilitation of lordosis produced by free E₂ was antagonized by the icv infusion of 10 μg of the ERβ antagonist PHTPP (n = 9). +++p < 0.001, ++p < 0.01 vs free E₂.

Like free E₂, the ER-subtype specific agonists, PPT and DPN, induced lordosis behavior as early as 30 min after injection. Others have reported a rapid facilitation of lordosis in rats primed with high E₂ doses (Kow and Pfaff, 1975) or when this treatment is followed by intravenous or intracerebral injection of P and some progestins (Beyer et al., 2003; Beyer et al., 1995; González-Mariscal et al., 1989; Kubli-Garfias and Whalen, 1977; Meyerson, 1972; Ross et al., 1971) or after vaginal cervical stimulation (VCS; Auger et al., 1997; González-Flores et al., 2007; González-Flores et al., 2008). These results led to the proposal that progestins, sensory stimulation or the activation of ERs exerts short-latency behavioral effects through a membrane mechanism (Bjornstrom and Sjoberg, 2004; Christensen and Micevych, 2013; Mhyre and Dorsa, 2006; Razandi et al., 1999; Srivastava et al., 2011).

The non-genomic actions of estrogens may be mediated through a subpopulation of ERα and ERβ located at the plasma membrane (Christensen and Micevych, 2013; Pappas et al., 1995; Razandi et al., 1999) or by a G-protein coupled receptor such as GPER-1, where they can regulate several aspects of female reproduction (Dewing et al., 2007; Kow and Pfaff, 2004). For example, the membrane effect of E₂ activates protein kinase A (PKA) and protein kinase C (PKC) in hypothalamic neurons (Dewing et al., 2008; Lagrange et al., 1997; Schreihöfer et al., 2001), increasing both E₂-induced nuclear signaling as well as lordosis behavior (Kow and Pfaff, 2004). The participation of several intracellular pathways in the facilitation of lordosis behavior by hormones or VCS in rats has been well studied in our laboratory (García-Juárez et al., 2013; González-Flores et al., 2008; Lima-Hernández et al., 2012;

Lima-Hernández et al., 2014). Thus, blockers of PKA, PKC or mitogen-activated protein kinase interfere with the stimulatory effect of progestins, peptides, prostaglandins and VCS on receptive behavior in E₂-primed rats (Blaustein and Erskine, 2002; Dewing et al., 2007; Dewing et al., 2008; García-Juárez et al., 2013; González-Flores et al., 2008; Kow and Pfaff, 2004; Lima-Hernández et al., 2012; Lima-Hernández et al., 2014; Mani et al., 1994; Micevych and Dewing, 2011).

E₂ can accumulate in specific brain areas where it binds ER α and ER β in neurons. Immunohistochemistry studies demonstrate the primary localization of both ERs within select regions of the brain including the preoptic area, ventral tegmental area and specific nuclei of the hypothalamus (Couse et al., 1997; Shughrue and Merchenthaler, 2001). Agonists and antagonists of ERs administered into the lateral ventricle travel by the foramen of Monro into the third ventricle (Battal et al., 2011) where they can cross the ependyma penetrating into the arcuate nucleus-median eminence, a circumscribed region of the mediobasal hypothalamus located around the infundibular recess of the third ventricle (Amat et al., 1999). These neuroanatomical regions are involved in the induction of lordosis behavior (Barfield and Chen, 1977; Blaustein and Turcotte, 1990; McEwen et al., 1979).

Previous behavioral and biochemical studies showed that the uninterrupted activation of ERs located in hypothalamus-preoptic area neurons, before or during the time of P action, is required for the optimal display of lordosis (Blaustein et al., 1979; Micevych and Dewing, 2011; Micevych and Sinchak, 2013). Based on this idea, we recently showed (Domínguez-Ordóñez et al., 2015) that there is a close relationship between the E₂ dose administered during priming and the quality and quantity of lordosis behavior induced by E₂ 40 h later. For example, 20 ng of free E₂ did not induce lordosis in female rats primed with 0.5 μ g of EB; however, it induced intense lordosis responses in females primed with 2 or 5 μ g of EB. Taken together these data suggest that sustained activation of ERs in brain cell nuclei is required for the full expression of lordosis behavior. This is biologically plausible, because circulating E₂ is elevated at the time of behavioral estrus in rats with intact ovaries.

The participation of both ER subtypes in the short latency effect of E₂ contrasts with the long-term priming effects of E₂, which are mediated primarily (or exclusively) by ER α . Studies using ER knockout (KO) mice (Kudwa and Rissman, 2003; Ogawa et al., 1999; Ogawa et al., 1998; Rissman et al., 1999; Tetel and Pfaff, 2010) showed that lordosis behavior was absent in ER α KO females treated with E₂ and P, whereas ER β KO females exhibited high levels of sexual receptivity. Moreover, experiments with antisense oligodeoxynucleotides (Ogawa et al., 1994; Wolf et al., 2008) or administration of ER subtype-selective ligands for ER α and ER β (Mazzucco et al., 2008) confirmed that ER α mediates long-term priming of lordosis by E₂. On the other hand, recent studies showed that GPER-1 may also be involved in the regulation of lordosis behavior in estrogen-primed rodents. Icv administration of the selective GPER-1 agonist, G1, significantly increased levels of lordosis in EB-primed rats, whereas the administration of G15, a GPER-1 antagonist, blocked lordosis (Long et al., 2014). In female mice, G1 was administered sc 48 and 24 h before behavioral testing, and it synergized with P to induce lordosis behavior; moreover G15 blocked this effect (Anchan et al., 2014).

5. Conclusions

In conclusion, our findings support the interpretation that the short-latency facilitation of lordosis behavior by E₂ in estrogen-primed rats, rather than being mediated only through the classical ER α , also involves the participation of ER β . It is likely that this is a non-genomic, membrane mechanism. However, the signaling pathways involved in the short-latency regulation of lordosis behavior, which is activated by ERs, are currently unknown.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement

The authors gratefully acknowledge the technical assistance of Guadalupe Domínguez-López. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Grant Number 134291. Raymundo Domínguez Ordóñez received a fellowship from CONACYT, Grant Number 230658.

References

- Amat, P., Pastor, F.E., Blázquez, J.L., Peláez, B., Sánchez, A., Álvarez-Morujó, A.J., Toranzo, D., Amat-Peral, G., 1999. Lateral evaginations from the third ventricle into the rat mediobasal hypothalamus: an amplification of the ventricular route. *Neuroscience* 88, 673–677.
- Anchan, D., Gafur, A., Sano, K., Ogawa, S., Vasudevan, N., 2014. Activation of the GPR30 receptor promotes lordosis in female mice. *Neuroendocrinology* 100, 71–80.
- Arai, Y., Gorski, R.A., 1968. Effect of anti-estrogen on steroid induced sexual receptivity in ovariectomized rats. *Physiol. Behav.* 3, 351–353.
- Auger, A.P., Moffatt, C.A., Blaustein, J.D., 1997. Progesterone-independent activation of rat brain progestin receptors by reproductive stimuli. *Endocrinology* 138, 511–514.
- Barfield, R.J., Chen, J.J., 1977. Activation of estrous behavior in ovariectomized rats by intracerebral implants of estradiol benzoate. *Endocrinology* 101, 1716–1725.
- Battal, B., Kocaoglu, M., Bulakbasi, N., Husmen, G., Tuba Sanal, H., Tayfun, C., 2011. Cerebrospinal fluid flow imaging by using phase-contrast MR technique. *Br. J. Radiol.* 84, 758–765.
- Beyer, C., González-Mariscal, G., 1986. Elevation in hypothalamic cAMP as common factor in the facilitation of lordosis in rodents: a working hypothesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 474, 270–281.
- Beyer, C., Morali, G., Vargas, R., 1971. Effect of diverse estrogens on estrous behavior and genital tract development in ovariectomized rats. *Horm. Behav.* 2, 273–277.
- Beyer, C., González-Flores, O., González-Mariscal, G., 1995. Ring A reduced progestins potently stimulate estrous behavior in rats: paradoxical effect through the progesterone receptor. *Physiol. Behav.* 58, 985–993.
- Beyer, C., González-Flores, O., González-Mariscal, G., 1997. Progesterone receptor participates in the stimulatory effect of LHRH, prostaglandin E₂, and cyclic AMP on lordosis and preceptive behaviours in rats. *J. Neuroendocrinol.* 9, 609–614.
- Beyer, C., González-Flores, O., García-Juarez, M., González-Mariscal, G., 2003. Non-ligand activation of estrous behavior in rodents: cross-talk at the progesterone receptor. *Scand. J. Psychol.* 44, 221–229.
- Bjornstrom, L., Sjöberg, M., 2004. Estrogen receptor-dependent activation of AP-1 via non-genomic signalling. *Nucl. Recept.* 2, 3.
- Blaustein, J.D., Erskine, M.S., 2002. Feminine sexual behavior: cellular integration of hormonal and afferent information in the rodent forebrain. In: Pfaff, D.W., et al. (Eds.), *Horm. Brain and Behav.* Academic Press, New York, pp. 139–214.
- Blaustein, J.D., Olster, D.H., 1989. Gonadal steroid hormone receptors and social behaviors. In: Balthazart, J. (Ed.), *Advances in Comparative and Environmental Physiology.* Springer-Verlag, Berlin, pp. 31–104.
- Blaustein, J.D., Turcotte, J.C., 1990. Down-regulation of progestin receptors in guinea pig brain: new findings using an immunocytochemical technique. *J. Neurobiol.* 21, 675–685.
- Blaustein, J.D., Wade, G.N., 1977. Sequential inhibition of sexual behavior by progesterone in female rats: comparison with a synthetic antiestrogen. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 91, 752–760.
- Blaustein, J.D., Dudley, S.D., Gray, J.M., Roy, E.J., Wade, G.N., 1979. Long-term retention of estradiol by brain cell nuclei and female rat sexual behavior. *Brain Res.* 173, 355–359.
- Bruning, J.L., Kintz, B.L., 1987. *Computational Handbook of Statistics.* Foresman and Company, London.
- Christensen, A., Micevych, P., 2013. A novel membrane estrogen receptor activated by STX induces female sexual receptivity through an interaction with mGluR1a. *Neuroendocrinology* 97, 363–368.
- Couse, J.F., Lindzey, J., Grandien, K., Gustafsson, J., Korach, K.S., 1997. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology* 138, 4613–4621.
- Davidson, J., Smith, E., Rodgers, C., Bloch, G., 1968. Relative thresholds of behavioral and somatic responses to estrogen. *Physiol. Behav.* 3, 227–229.
- Dewing, P., Boulware, M.I., Sinchak, K., Christensen, A., Mermelstein, P.G., Micevych, P., 2007. Membrane estrogen receptor-alpha interactions with metabotropic glutamate receptor 1a modulate female sexual receptivity in rats. *J. Neurosci.* 27, 9294–9300.
- Dewing, P., Christensen, A., Bondar, G., Micevych, P., 2008. Protein kinase C signaling in the hypothalamic arcuate nucleus regulates sexual receptivity in female rats. *Endocrinology* 149, 5934–5942.
- Dillon, T.S., Fox, L.C., Han, C., Linster, C., 2013. 17beta-estradiol enhances memory duration in the main olfactory bulb in CD-1 mice. *Behav. Neurosci.* 127, 923–931.
- Domínguez-Ordóñez, R., García-Juárez, M., Lima-Hernández, F.J., Gómora-Arrati, P., Blaustein, J.D., González-Flores, O., 2015. Sexual receptivity facilitated by unesterified estradiol: dependence on estrogen and progesterone receptors and priming dose of estradiol benzoate. *Behav. Neurosci.* 129, 777–788.

- Edwards, D., Whalen, R., Nadler, R., 1968. Induction of estrus: estrogen-progesterone interactions. *Physiol. Behav.* 3, 29–33.
- Etgen, A.M., 1979. Antiestrogens: effects of tamoxifen, nafoxidine, and CI-628 on sexual behavior, cytoplasmic receptors, and nuclear binding of estrogen. *Horm. Behav.* 13, 97–112.
- García-Juárez, M., Beyer, C., Gómora-Arrati, P., Domínguez-Ordóñez, R., Lima-Hernández, F.J., Eguibar, J.R., Galicia-Aguas, Y.L., Etgen, A.M., González-Flores, O., 2013. Lordosis facilitation by leptin in ovariectomized, estrogen-primed rats requires simultaneous or sequential activation of several protein kinase pathways. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 110, 13–18.
- González-Flores, O., Beyer, C., Lima-Hernández, F.J., Gómora-Arrati, P., Gomez-Camarillo, M.A., Hoffman, K., Etgen, A.M., 2007. Facilitation of estrous behavior by vaginal cervical stimulation in female rats involves alpha1-adrenergic receptor activation of the nitric oxide pathway. *Behav. Brain Res.* 176, 237–243.
- González-Flores, O., Etgen, A.M., Komisaruk, B.K., Gómora-Arrati, P., Macías-Jimenez, A., Lima-Hernández, F.J., García-Juárez, M., Beyer, C., 2008. Antagonists of the protein kinase A and mitogen-activated protein kinase systems and of the progesterin receptor block the ability of vaginocervical/flank-perineal stimulation to induce female rat sexual behaviour. *J. Neuroendocrinol.* 20, 1361–1367.
- González-Mariscal, G., González-Flores, O., Beyer, C., 1989. Intrahypothalamic injection of RU486 antagonizes the lordosis induced by RU486-reduced progestins. *Physiol. Behav.* 46, 435–438.
- González-Mariscal, G., Melo, A.I., Beyer, C., 1993. Progesterone, but not LHRH or prostaglandin E2, induces sequential inhibition of lordosis to various lordogenic agents. *Neuroendocrinology* 57, 940–945.
- Greco, B., Allegretto, E.A., Tetel, M.J., Blaustein, J.D., 2001. Coexpression of ER beta with ER alpha and progesterin receptor proteins in the female rat forebrain: effects of estradiol treatment. *Endocrinology* 142, 5172–5181.
- Greco, B., Blasberg, M.E., Kosinski, E.C., Blaustein, J.D., 2003. Response of ERalpha-IR and ERbeta-IR cells in the forebrain of female rats to mating stimuli. *Horm. Behav.* 43, 444–453.
- Green, R., Luttge, W.G., Whalen, R.E., 1970. Induction of receptivity in ovariectomized female rats by a single intravenous injection of estradiol-17. *Physiol. Behav.* 5, 137–141.
- Hardy, D.F., DeBold, J.F., 1972. Effects of coital stimulation upon behavior of the female rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 78, 400–408.
- Harris, G.W., Michael, R.P., 1964. The activation of sexual behaviour by hypothalamic implants of oestrogen. *J. Physiol.* 171, 275–301.
- Ikeda, Y., Nagai, A., Ikeda, M.A., Hayashi, S., 2003. Sexually dimorphic and estrogen-dependent expression of estrogen receptor beta in the ventromedial hypothalamus during rat postnatal development. *Endocrinology* 144, 5098–5104.
- Kow, L.M., Pfaff, D.W., 1975. Induction of lordosis in female rats: two modes of estrogen action and the effect of adrenalectomy. *Horm. Behav.* 6, 259–276.
- Kow, L.M., Pfaff, D.W., 1998. Mapping of neural and signal transduction pathways for lordosis in the search for estrogen actions on the central nervous system. *Behav. Brain Res.* 92, 169–180.
- Kow, L.M., Pfaff, D.W., 2004. The membrane actions of estrogens can potentiate their lordosis behavior-facilitating genomic actions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (12), 354–1357.
- Kubli-Garfias, C., Whalen, R.E., 1977. Induction of lordosis behavior in female rats by intravenous administration of progestins. *Horm. Behav.* 9, 380–386.
- Kudwa, A.E., Rissman, E.F., 2003. Double oestrogen receptor alpha and beta knockout mice reveal differences in neural oestrogen-mediated, progesterin receptor induction and female sexual behaviour. *J. Neuroendocrinol.* 15, 978–983.
- Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S., Gustafsson, J.A., 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138, 863–870.
- Lagrange, A.H., Ronnekleiv, O.K., Kelly, M.J., 1997. Modulation of G protein-coupled receptors by an estrogen receptor that activates protein kinase A. *Mol. Pharmacol.* 51, 605–612.
- Levin, E.R., 2001. Cell localization, physiology, and non-genomic actions of estrogen receptors. *J. Appl. Physiol.* 91, 1860–1867.
- Lima-Hernández, F.J., Beyer, C., Gómora-Arrati, P., García-Juárez, M., Encarnación-Sánchez, J.L., Etgen, A.M., González-Flores, O., 2012. Src kinase signaling mediates estrous behavior induced by 5beta-reduced progestins, GnRH, prostaglandin E2 and vaginocervical stimulation in estrogen-primed rats. *Horm. Behav.* 62, 579–584.
- Lima-Hernández, F.J., Gómora-Arrati, P., García-Juárez, M., Blaustein, J.D., Etgen, A.M., Beyer, C., González-Flores, O., 2014. Estrogen receptors regulate the estrous behavior induced by progestins, peptides, and prostaglandin E2. *Horm. Behav.* 66, 361–368.
- Lisk, R.D., 1962. Diencephalic placement of estradiol and sexual receptivity in the female rat. *Am. J. Phys.* 203, 493–496.
- Long, N., Serey, C., Sinchak, K., 2014. 17β-estradiol rapidly facilitates lordosis through G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) via deactivation of medial preoptic nucleus μ-opioid receptors in estradiol primed female rats. *Horm. Behav.* 66, 663–666.
- Mani, S.K., Allen, J.M., Clark, J.H., Blaustein, J.D., O'Malley, B.W., 1994. Convergent pathways for steroid hormone- and neurotransmitter-induced rat sexual behavior. *Science* 265, 1246–1249.
- Mani, S.K., Allen, J.M., Lydon, J.P., Mulac-Jericevic, B., Blaustein, J.D., DeMayo, F.J., Conneely, O., O'Malley, B.W., 1996. Dopamine requires the unoccupied progesterone receptor to induce sexual behavior in mice. *Mol. Endocrinol.* 10, 1728–1737.
- Mazzucco, C.A., Walker, H.A., Pawlowski, J.L., Lieblich, S.E., Galea, L.A., 2008. ERalpha, but not ERbeta, mediates the expression of sexual behavior in the female rat. *Behav. Brain Res.* 191, 111–117.
- McEwen, B.S., Davis, P.G., Parsons, B., Pfaff, D.W., 1979. The brain as a target for steroid hormone action. *Annu. Rev. Neurosci.* 2, 65–112.
- Meyerson, B., 1972. Latency between intravenous injection of progestins and the appearance of estrous behavior in estrogen-treated ovariectomized rats. *Horm. Behav.* 3, 1–9.
- Mhyre, A.J., Dorsa, D.M., 2006. Estrogen activates rapid signaling in the brain: role of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta in neurons and glia. *Neuroscience* 138, 851–858.
- Micevych, P.E., Dewing, P., 2011. Membrane-initiated estradiol signaling regulating sexual receptivity. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 2, 1–9.
- Micevych, P.E., Sinchak, K., 2013. Temporal and concentration-dependent effects of oestradiol on neural pathways mediating sexual receptivity. *J. Neuroendocrinol.* 25, 1012–1023.
- Ogawa, S., Olazabal, U.E., Parhar, I.S., Pfaff, D.W., 1994. Effects of intrahypothalamic administration of antisense DNA for progesterone receptor mRNA on reproductive behavior and progesterone receptor immunoreactivity in female rat. *J. Neurosci.* 14, 1766–1774.
- Ogawa, S., Eng, V., Taylor, J., Lubahn, D.B., Korach, K.S., Pfaff, D.W., 1998. Roles of estrogen receptor-alpha gene expression in reproduction-related behaviors in female mice. *Endocrinology* 139, 5070–5081.
- Ogawa, S., Chan, J., Chester, A.E., Gustafsson, J.A., Korach, K.S., Pfaff, D.W., 1999. Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor beta gene-deficient (betaERKO) male and female mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (12), 887–12,892.
- Pappas, T.C., Gametchu, B., Watson, C.S., 1995. Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *FASEB J.* 9, 404–410.
- Paxinos, G., Watson, C., 2006. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6th ed. Academic Press, Sydney, Australia.
- Ramírez-Orduña, J.M., Lima-Hernández, F.J., García-Juárez, M., González-Flores, O., Beyer, C., 2007. Lordosis facilitation by LHRH, PGE2 or db-cAMP requires activation of the kinase A signaling pathway in estrogen primed rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 86, 169–175.
- Razandi, M., Pedram, A., Greene, G.L., Levin, E.R., 1999. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Endocrinol.* 13, 307–319.
- Rissman, E.F., Wersinger, S.R., Fugger, H.N., Foster, T.C., 1999. Sex with knockout models: behavioral studies of estrogen receptor alpha. *Brain Res.* 835, 80–90.
- Rodríguez-Sierra, J.F., Komisaruk, B.R., 1978. Lordosis induction in the rat by prostaglandin E2 systemically or intracranially in the absence of ovarian hormones. *Prostaglandins* 15, 513–524.
- Ross, J., Claybaugh, C., Clemens, L.G., Gorski, R.A., 1971. Short latency induction of estrous behavior with intracerebral gonadal hormones in ovariectomized rats. *Endocrinology* 89, 32–38.
- Roy, E.J., Wade, G.N., 1977. Binding of [3-H]estradiol by brain cell nuclei and female rat sexual behavior: inhibition by antiestrogens. *Brain Res.* 126, 73–87.
- Santollo, J., Katzenellenbogen, B.S., Katzenellenbogen, J.A., Eckel, L.A., 2010. Activation of ERalpha is necessary for estradiol's anorexigenic effect in female rats. *Horm. Behav.* 58, 872–877.
- Schreihöfer, D.A., Resnick, E.M., Lin, V.Y., Shupnik, M.A., 2001. Ligand-independent activation of pituitary ER: dependence on PKA-stimulated pathways. *Endocrinology* 142, 3361–3368.
- Shughrue, P.J., Merchenthaler, I., 2001. Distribution of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 436, 64–81.
- Shughrue, P.J., Komm, B., Merchenthaler, I., 1996. The distribution of estrogen receptor-beta mRNA in the rat hypothalamus. *Steroids* 61, 678–681.
- Shughrue, P.J., Lane, M.V., Merchenthaler, I., 1997. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 388, 507–525.
- Shughrue, P.J., Lane, M.V., Scrimo, P.J., Merchenthaler, I., 1998. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the rat pituitary, gonad, and reproductive tract. *Steroids* 63, 498–504.
- Simerly, R.B., Young, B.J., 1991. Regulation of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus by sex steroid hormones. *Mol. Endocrinol.* 5, 424–432.
- Srivastava, D.P., Waters, E.M., Mermelstein, P.G., Kramar, E.A., Shors, T.J., Liu, F., 2011. Rapid estrogen signaling in the brain: implications for the fine-tuning of neuronal circuitry. *J. Neurosci.* 31, 16,056–16,063.
- Tetel, M.J., Pfaff, D.W., 2010. Contributions of estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta to the regulation of behavior. *Biochim. Biophys. Acta* 1800, 1084–1089.
- Walf, A.A., Ciriza, I., Garcia-Segura, L.M., Frye, C.A., 2008. Antisense oligodeoxynucleotides for estrogen receptor-beta and alpha attenuate estradiol's modulation of affective and sexual behavior, respectively. *Neuropsychopharmacology* 33, 431–440.
- Zemlan, F.P., Adler, N.T., 1977. Hormonal control of female sexual behavior in the rat. *Horm. Behav.* 9, 345–357.

14.3. Las hormonas y la conducta sexual femenina. Ciencia, Revista de la Academia Mexicana de Ciencias. 2015.

Óscar González Flores, Marcos García Juárez y Raymundo Domínguez Ordóñez



Las **hormonas** y la **conducta sexual femenina**

El Dr. Carlos Beyer y su grupo de colaboradores hemos abordado el estudio de la conducta sexual femenina como un modelo para explorar los mecanismos celulares y moleculares activados por diferentes compuestos, como hormonas esteroides y péptidos, entre otros. En este artículo sólo describimos algunos resultados que han contribuido a la comprensión de los mecanismos que regulan la conducta sexual femenina en la rata.



Introducción

La conducta sexual femenina ha sido estudiada desde muchas perspectivas y en diferentes campos del conocimiento. Algunos científicos la han analizado desde un punto de vista conductual; otros, desde una perspectiva comparativa; algunos más, desde un enfoque evolutivo; en nuestro caso particular, la hemos utilizado como una herramienta para estudiar los mecanismos celulares y moleculares activados por diferentes compuestos.

Descripción de la conducta sexual femenina

Durante la actividad sexual, las hembras de los roedores presentan tres patrones: atractividad, proceptividad y receptividad. La atractividad comprende eventos no conductuales, como la emisión de señales odoríferas (feromonas) que hacen atractiva a la hembra para un

macho sexualmente activo. La proceptividad engloba una serie de patrones motores que la hembra realiza y que están dirigidos al macho para atraerlo y eventualmente copular con él. Los patrones más evidentes de la proceptividad son los brinco que la hembra realiza sobre sus cuatro patas y finaliza adoptando una postura de inmovilidad, o bien, las carreras cortas en forma de zig-zag que terminan abruptamente con la inmovilidad de la hembra. El tercer patrón proceptivo es el orejeo, caracterizado por un movimiento de alta frecuencia de la cabeza que provoca la vibración de las orejas. Por

otro lado, el patrón conductual de receptividad sexual más representativo de una hembra en estro consiste en la dorsiflexión de la región lumbar de la columna vertebral, seguida por la elevación de la región perianal y un movimiento lateral de la cola (conducta de lordosis).

Regulación hormonal de la conducta sexual femenina

La inducción de la conducta sexual femenina depende de la secreción, desde los ovarios, de hormonas como el estradiol y, horas después, la progesterona; este evento está sincronizado con la ovulación. Dicha conducta se presenta cada cuatro o cinco días, cuando ambas hormonas vuelven a alcanzar sus niveles máximos.

Se ha demostrado que la remoción de los ovarios (ovariectomía) produce una disminución inmediata en la concentración de estas hormonas y, por lo tanto, se deja de producir la conducta sexual femenina. Sin em-





bargo, la administración exógena de estradiol, seguida de 18 a 40 horas por progesterona, restaura la expresión de dicha conducta. Si la ovariectomía se realiza cuando ya ha ocurrido la liberación máxima de estradiol, pero antes de que ocurra el pico preovulatorio de progesterona, no se presenta el despliegue normal de la conducta sexual femenina. No obstante, si al momento de la ovariectomía se administra progesterona, la conducta sexual femenina se facilita de manera normal.

A la fecha se ha demostrado que el estradiol, al unirse a sus receptores intracelulares localizados en el cerebro, induce la síntesis de receptores de la progesterona, y la unión de la progesterona con su receptor facilita la expresión de la conducta sexual femenina.

En estudios sistemáticos dirigidos por el Dr. Beyer en la década de 1970, se mostró que la conducta sexual femenina en roedores podría ser inducida mediante la inyección de dosis repetidas de estrógenos, como el estradiol. Otros estudios también revelaron que la expresión de los componentes de la conducta sexual es

de-pendiente de la dosis de estradiol, ya que con dosis altas la intensidad de la lordosis es mayor. De manera similar, la frecuencia con la que la hembra presenta algunas conductas proceptivas se relaciona con la dosis de estradiol, aunque estas conductas han sido mayormente atribuidas al efecto de la progesterona. Además, en ratas ovariectomizadas tratadas con dosis altas de estradiol, se prolonga la duración del periodo de receptividad; es decir, la duración de la conducta sexual femenina es más larga cuando se administra solamente estradiol y es más corta cuando se adiciona progesterona.

Por otro lado, se sabe que la progesterona es rápidamente metabolizada en el sistema nervioso central a progestinas reducidas en el anillo A (también conocidas como neuroesteroides). Estos metabolitos carecen de afinidad por el receptor a progesterona intracelular y por lo tanto no tienen efectos genómicos; sin embargo, adquieren nuevas propiedades, como la capacidad de interactuar con algunos componentes de la membrana celular (véase la Figura 1). Así, algunos experimentos

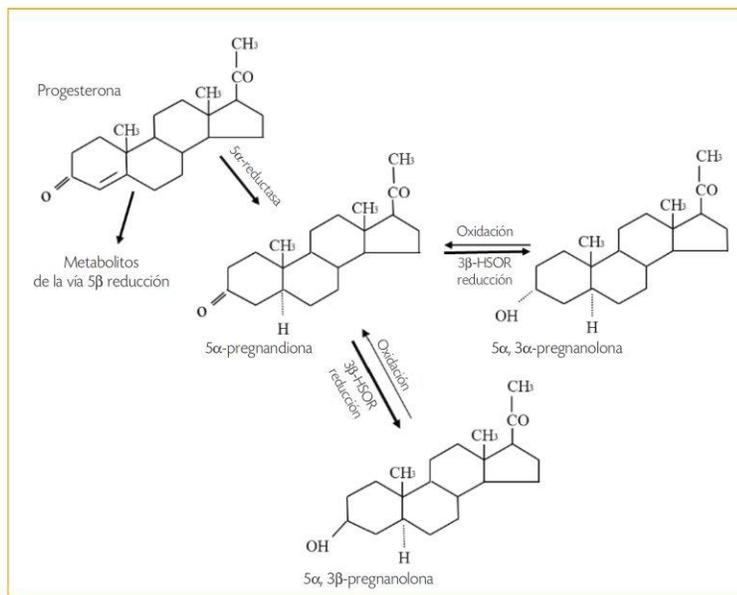


Figura 1. Metabolismo de la progesterona. Ésta es convertida en el sistema nervioso central principalmente a metabolitos 5α reducidos en el anillo A por la acción de enzimas reductasas.



mostraron que la administración intracerebral o intravenosa de esas progestinas a la rata ovariectomizada y pretratada con estradiol indujo una intensa expresión de la conducta de lordosis, inclusive de manera más eficaz que la progesterona. Estos hallazgos generaron importantes preguntas sobre dónde y cómo están actuando esos compuestos para facilitar la conducta sexual femenina.

Otros hallazgos mostraron que la conducta sexual femenina también puede ser facilitada por compuestos con estructuras químicas no esteroideas y, por lo tanto, no muestran afinidad por el receptor a progesterona. Así, parece que la conducta sexual femenina es activada a través de una “comunicación cruzada” entre compuestos que ejercen su efecto intracelularmente, como las hormonas esteroideas, y aquellos que no penetran a la célula y ejercen su efecto a partir de unirse a receptores ubicados en la membrana celular.

Mecanismos celulares involucrados en la facilitación de la conducta sexual femenina

Los mecanismos celulares propuestos en la facilitación de la conducta sexual femenina por diferentes hormonas inicialmente fueron clasificados en genómicos y membranales, según la naturaleza de la hormona y los tipos de receptores involucrados. Actualmente, se ha propuesto que algunos compuestos, diferentes a los esteroides, ejercen su efecto sobre receptores membranales y activan o inhiben indirectamente, a través de esa comunicación cruzada, a los receptores a esteroides intracelulares.

En esta sección se describirán algunos de los modelos que se han propuesto en la regulación de la conducta sexual femenina en la rata, en donde nosotros, además de extender la lista de compuestos que activan al receptor de progesterona, proponemos que una proteína (de la familia de la tirosina cinasa, la Src) anclada a la membrana celular, y a través de una comunicación cruzada con los receptores a esteroides, podría tener un papel esencial en la regulación de la conducta sexual femenina inducida por diferentes compuestos.

Receptores a esteroides

Los mecanismos celulares involucrados en la regulación de la conducta sexual femenina requieren de la participación de los receptores a esteroides. Así, los receptores a estrógenos y los de progesterona son factores de transcripción, por lo que ejercen sus efectos directamente sobre el genoma promoviendo la síntesis de proteínas. Se han caracterizado dos tipos funcionales para cada tipo de receptor: α y β para los de estrógenos, A y B para los de progesterona.

En las áreas cerebrales relacionadas con la regulación de la conducta sexual femenina, se han encontrado tanto el receptor a estrógenos como el receptor de progesterona. Sin embargo, los efectos que éstos producen en esas áreas son temporalmente diferentes, ya que el receptor de estrógenos debe permanecer unido al estradiol durante un largo periodo (18 a 24 horas) para inducir la síntesis del receptor de progesterona. Además, tras la administración de antagonistas para cada receptor, se han podido bloquear los efectos genómicos que ejerce cada uno de ellos y, así, se han determina-



do los efectos diferenciales que tienen sobre diversos procesos. Por ejemplo, existen datos que señalan que el receptor de estrógenos α participa en el efecto de los estrógenos para la expresión de la conducta sexual femenina.

Mecanismo genómico

El mecanismo genómico fue propuesto para explicar la activación de la conducta sexual femenina por esteroides. Se consideran fundamentalmente dos pasos: el primero consiste en que la hormona atraviesa la membrana celular por difusión pasiva, y una vez dentro de la célula se une a su receptor, formando así un complejo hormona-receptor activo. En el segundo paso, ese complejo va del citoplasma al núcleo, en donde se une al ADN y promueve la síntesis de proteínas. Este modelo es válido para los efectos preparadores del estradiol, ya que, como se mencionó, se requiere de un periodo largo (18 a 24 horas) para que el complejo estrógeno-receptor prepare al tejido nervioso para la expresión de la conducta sexual femenina. Sin embargo, una vez “preparado” el sustrato neural, la conducta se “dispara” por la progesterona u otros compuestos no esteroideos que actúan a nivel de la membrana celular.

Comunicación cruzada

Como se comentó en secciones anteriores, el grupo del Dr. Beyer fue el primero en proponer el modelo de la comunicación cruzada entre receptores a esteroides y compuestos que ejercen sus efectos en la membrana celular para la facilitación de la conducta sexual femenina (véase la Figura 2). Este modelo consiste en que la

administración de estrógenos promueve la síntesis de proteínas, entre ellas, receptores de progesterona, que se encuentran en estado inactivo. Este modelo propone que los receptores a progesterona se activan naturalmente por la hormona, pero también pueden hacerlo otros compuestos no esteroideos al actuar sobre sus receptores membranales. Con esta idea, en la actualidad se ha propuesto al receptor de progesterona como el mediador molecular común entre ambos mecanismos. Particularmente, los compuestos no esteroideos tienen características moleculares muy diversas; sin embargo, promueven la activación de enzimas llamadas cinasas, que producen un efecto conocido como fosforilación del receptor de progesterona.

Participación de la tirosina cinasa Src en la regulación de la conducta sexual femenina

Existen varias enzimas que fosforilan diferentes proteínas que se agrupan bajo el término cinasas. La Src forma parte de la familia de la tirosina cinasa anclada a la membrana celular y es una vía de señalización que hemos estudiado en la regulación de la conducta sexual femenina. Esta molécula tiene la particularidad de que en su estado activo permite la unión del receptor de estrógenos en un sitio de la molécula denominado SH2, y al receptor de progesterona en el sitio SH3 de la misma molécula (Figura 3). Así, una vez formado este complejo enzima/receptores, activará a la MAPcinasa

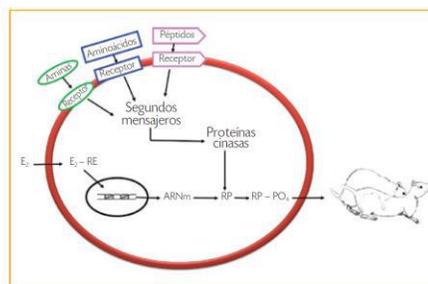


Figura 2. Modelo de comunicación cruzada entre los mecanismos membranal y genómico. Compuestos que ejercen su efecto sobre la membrana de las células involucradas en la activación de la conducta sexual femenina: E_2 , estradiol; E_2-RE , complejo estradiol-receptor de estrógenos; ARNm, ácido ribonucleico mensajero; RP, receptor de la progesterona; $RP-PO_4$, receptor de la progesterona fosforilado.

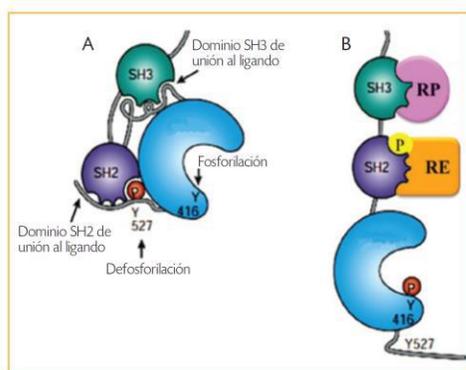


Figura 3. Activación de la cinasa Src. A) conformación inactiva de la cinasa Src; B) conformación activa de la cinasa Src, el receptor de la progesterona (RP) se une al dominio SH3 y el receptor de estrógenos (RE) se une al dominio SH2. Modificado desde Martin GS, 2001.

(MAPK) para que finalmente fosforile a diversas proteínas y en consecuencia se produzca la función celular. El proceso es complejo y, naturalmente, la conducta sexual femenina no es el resultado exclusivo de la fosforilación de un receptor, sino que involucra una serie de cambios en todo el organismo. Sin embargo, a nivel del sistema nervioso central, donde se integra esta conducta, éstos podrían ser los mecanismos involucrados.

Conclusión

En este artículo hemos resaltado brevemente los trabajos que han contribuido al entendimiento de la modulación del sistema nervioso central a través de diferentes hormonas y mecanismos, utilizando para ello el modelo de la conducta sexual femenina. Existe evidencia considerable acerca de la capacidad del estradiol y de la progesterona, así como de otras moléculas con diferentes estructuras, para activar vías de señalización intracelular tanto en el cerebro como en tejidos periféricos. De tal manera, cuando son administrados los compuestos que actúan directamente sobre receptores membranales o sobre receptores intracelulares, son capaces de generar una comunicación cruzada, lo que provoca el incremento de la señal que resulta en una respuesta amplificada en neuronas específicas.

Oscar González Flores es doctor en Biología de la Reproducción e investigador del Centro Carlos Beyer de Investigación en Reproducción Animal, del Cinvestav y la Universidad Autónoma de Tlaxcala. Actualmente es miembro de Sistema Nacional de Investigadores, nivel II. Sus líneas de investigación abarcan la neuroendocrinología de la reproducción, el estudio de los mecanismos moleculares de acción de las hormonas esteroides y los efectos neuroprotectores de esteroides ante un episodio de isquemia cerebral global. oglezflo@gmail.com

Marcos García Juárez es doctor en Ciencias Fisiológicas. Actualmente trabaja en el estudio de los efectos neuroprotectores de esteroides ante un episodio de isquemia cerebral global, en el Centro Carlos Beyer de Investigación en Reproducción Animal, del Cinvestav y la Universidad Autónoma de Tlaxcala. garcia_juarez_marcos@yahoo.com.mx

Raymundo Domínguez Ordóñez es maestro en Ciencias Biológicas y actualmente cursa el doctorado en Ciencias Biológicas en el Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta. Estudia los mecanismos celulares involucrados en la estimulación de la conducta de lordosis inducida por la administración de estrógenos en la rata. raydon2904@gmail.com

Lecturas recomendadas

- Beyer, C., G. Morali y R. Vargas (1971), "Effect of diverse estrogens on estrous behavior and genital tract development in ovariectomized rats", *Hormones and Behavior*, 2:273-277.
- Beyer, C., O. González Flores, M. García Juárez y G. González Mariscal (2003), "Non-ligand activation of estrous behavior in rodents: cross-talk at the progesterone receptor", *Scandinavian Journal of Psychology*, 44:221-229.
- González Flores, O., C. Beyer, P. Gómora Arrati, et al. (2010), "A role for Src kinase in progestin facilitation of estrous behavior in estradiol-primed female rats", *Hormones and Behavior*, 58:223-229.
- Martin, G. (2001), "The hunting of the Src", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2:467-475.
- Morali, G. y C. Beyer (1979), "Neuroendocrine control of mammalian estrous behavior", en C. Beyer (comp.), *Endocrine control of sexual behavior*, Nueva York, Raven Press, pp. 33-75.