



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

**La Conducta de lordosis inducida por oxitocina involucra la
síntesis de PGE2 y la subsecuente liberación de GNRH en
ratas pretratadas con estradiol**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

MVZ Sandra Tapia Hernández

Director de Tesis. - Dr. Oscar González Flores

Co director de Tesis. - Dr. Raymundo Domínguez Ordóñez

Tlaxcala, Tlax.

Junio 2022

Tlaxcala, Tlax.

Junio 2022



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

La conducta de lordosis inducida por oxitocina involucra la síntesis de PGE₂ y la subsecuente liberación de GNRH en ratas pretratadas con estradiol

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

MVZ Sandra Tapia Hernández

Comité Tutorial

Dr. Oscar González Flores

Dr. Raymundo Domínguez Ordoñez

Dra. Dora Luz Corona Quintanilla

Dr. Marcos García Juárez

Tlaxcala, Tlax.

Junio 2022

Tlaxcala, Tlax.

Junio 2022

FINANCIAMIENTO

Esta tesis se realizó en el Centro de Investigación en Reproducción Animal, unidad Panotla, de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

El proyecto fue realizado con el financiamiento económico del CONACYT con la beca de maestría número 1006648 a partir del 1 de agosto de 2019 al 31 de julio de 2021.

AGRADECIMIENTOS

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

Al CONACYT, por haberme otorgado la beca número 1006648, a partir del 1de agosto de 2019 al 31 de julio de 2021 con la finalidad de cursar la Maestría en Ciencias Biológicas.

Al Dr. Oscar González Flores, quien además de ser un excelente y admirable doctor, ha sido un gran ejemplo. Además, por permitirme pertenecer a su excelente grupo de trabajo en el laboratorio que dignamente dirige, por su confianza y paciencia para transmitir sus conocimientos en el área de la ciencia.

Al Dr. Raymundo Domínguez Ordóñez, por su gran apoyo en la elaboración de este trabajo de tesis, por brindarme su amistad, y ser un ejemplo a seguir.

Al Dr. Marcos García Juárez por su gran capacidad de consejero, amigo y guía para la realización, revisión y asesoría de esta tesis.

A la Dra. Dora Luz Quintanilla por su gran empeño en la realización, revisión y asesoría de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A Dios por ser mi mayor fuente de fe, por darme salud para seguir mis sueños, por darme la capacidad que necesito para la realización de este trabajo.

Al Dr. Raymundo Domínguez Ordoñez por transmitirme sus conocimientos y enseñarme a través del ejemplo que la constancia es la base del triunfo.

Al Dr. Marcos García Juárez, por su inigualable amistad, por toda la paciencia que me demostró y por el inmenso apoyo que me brindo cuando lo necesite además por ser un gran ejemplo por seguir.

A mi compañera Ailyn Luna Hernández por enseñarme que en esta vida no hay situaciones imposibles, por acompañarme a lo largo de mis estudios y sobre todo por brindarme su amistad.

A Miriam Ely Galindo por su amistad y por hacer más llevaderas las horas de trabajo.

A todos los Doctores del Laboratorio que gracias a su ejemplo y capacidad me sirvieron de ejemplo para continuar con mis estudios.

A mi familia, por el cariño la comprensión y el apoyo que me brindaron durante el proceso de mi formación, en las horas de trabajo que no comparti con ellos, porque sin ellos este sueño no sería posible.

DEDICATORIAS

A mi esposo quien con su amor y cariño me ha impulsado a seguir mis sueños y con su apoyo he logrado alcanzarlos.

A mi papá, Daniel quien siempre ha depositado en mí su confianza y que me ha enseñado que la constancia te lleva a la perseverancia.

A mi mama, Mary que con su inmenso amor me apoya de manera incondicional y me brinda el soporte que necesito.

A mi hija Fátima, quien ha sido un verdadero apoyo para mí al mostrarme su amor para impulsarme a luchar por un mejor futuro.

.

A mi hija Fernanda porque con su amor y cariño me ayudo a superar los momentos difíciles.

A mi hija Valeria porque con su alegría me inyecta las ganas para seguir adelante y por llenar mis días de felicidad.

A mis maestros, que me formaron en el área del conocimiento por compartir sus enseñanzas y experiencias y que hicieron posible la realización de este trabajo.

INDICE

	Página
1. INTRODUCCION.....	3
1.1. El ciclo estral de la rata	3
1.2. Conducta de estro en la rata	5
1.3. Regulación hormonal de la conducta de lordosis.....	6
1.4. Neuroanatomía de la conducta de lordosis.	10
1.5. El receptor intracelular a progesterona	14
1.5.1. Características estructurales y farmacológicas del receptor a Progesterona	15
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
1.6. Oxitocina.....	18
1.6.1. Receptor de oxitocina.....	20
1.6.2. Atosiban.....	22
1.6.3. PGE2.....	23
1.6.4. Aspirina.....	24
1.6.5. Receptor EP4.....	25
1.6.6. ONO- AE3-208.....	26
1.6.7. GnRH.....	27
1.6.8. Receptor GnRH-1	28
1.6.9. Antide.....	29
2. Antecedentes.....	30
3. Justificación.....	32
4. Hipótesis.....	32

5. Objetivos	32
5.1. Objetivo General	32
5.2. Objetivos específicos	33
6. Metodología	33
6.1. Ovariectomía	33
6.2. Implante intracerebroventricular	34
6.3. Conducta de lordosis	34
6.4. Comprobación del área de implante	35
6.5. Fármacos	35
6.6. Análisis estadístico	36
7. Procedimiento experimental	37
8. Resultados	38
Fig. 13.....	39
Fig. 14.....	41
Fig. 15	42
9. Discusión	43
10. Conclusiones	47
11. Perspectivas	47
12. Bibliografía	48
13. Glosario de Términos	68
14. Anexos	70

Resumen

La conducta de lordosis (CL) en la rata es inducida por la acción secuencial entre el estradiol (E2) y la progesterona (P) o bien por compuestos con diferente estructura química como la prostaglandina E2 (PGE₂) y oxitocina (OXT), cuyo efecto sea probablemente a través de la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en el hipotálamo. Este péptido al unirse a sus receptores GnRH-1 localizados en la membrana de neuronas postsinápticas provoca la liberación de segundos mensajeros que son los responsables de fosforilar a sus respectivas proteínas cinasas. Por lo tanto, cuando el receptor de progesterona (RP) es activado, a través de la fosforilación en los aminoácidos de serina, se despliega la CL. Actualmente existe controversia si las neuronas productoras de GnRH contienen receptores a estrógenos o de otro tipo como los de OXT o de PGE₂. Sin embargo, se ha demostrado que los astrocitos cercanos a las neuronas liberadoras de GnRH expresan receptores a OXT, por lo que al ser activados provocan la síntesis y liberación de PGE₂, que, a su vez, activan a sus receptores membranales localizados en las neuronas liberadoras de GnRH provocando la liberación de GnRH.

Se ha propuesto que estos compuestos con estructura no esteroidea desencadenan la CL a través de la liberación de GnRH, por lo tanto, proponemos que la vía que desencadena OXT involucra la síntesis de PGE₂ probablemente desde los astrocitos y culmina con la liberación de GnRH.

Estudios recientes demuestran que la administración intracerebroventricular (ICV) de OXT induce un claro comportamiento de lordosis (cociente de lordosis e intensidad de lordosis) en ratas preparadas con estrógenos. El presente estudio exploró la hipótesis de que la vía OXT-PGE₂-GnRH (una vía producida en los astrocitos) está involucrada en la facilitación del comportamiento de la lordosis mediante la administración ICV de OXT (2 µg). En el experimento 1, probamos la participación del receptor de OXT (OXTR) mediante la infusión del antagonista de OXTR, atosiban. La lordosis inducida por OXT se redujo significativamente a los 30 y 120 minutos por la infusión previa de atosiban. En el experimento 2, estudiamos los efectos de la aspirina (inhibidor de COX2) y ONO-AE3-208 (antagonista del receptor de prostaglandina EP4) sobre la lordosis inducida por OXT. Las

infusiones de ambos compuestos inhibieron la lordosis inducida por OXT a los 120 y 240 min. En el experimento 3, se evaluó la participación de antide inhibidor del receptor de GnRH-1 en la lordosis inducida por OXT. Estos resultados indican que la vía OXT / PGE2 / GnRH está involucrada en la expresión del comportamiento de lordosis inducida por OXT, un efecto que puede estar ocurriendo directamente en los astrocitos hipotalámicos.

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, el cual es acompañado por la manifestación de la conducta de estro. Sin embargo, la rata presenta un ciclo estral de corta duración (4 o 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 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), el cual al ejercer sus efectos sobre el hipotálamo provoca la liberación de GnRH (Guerra-Araiza y cols. 2003). A su vez, GnRH puede activar a sus receptores ubicados en la hipófisis anterior provocando la liberación de 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 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 (P), 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 vagino-cervical provista por el macho está asociada a un incremento en los picos de secreción de prolactina (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) así como el incremento de OXT (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 P (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 P (Freeman 2005) que al no existir gestación rápidamente deja de ser funcional, es decir, deja de secretar P.

Tabla 1. *Concentraciones plasmáticas de 17-β estradiol y progesterona (P) en suero de rata durante el ciclo estral.*

Tabla 1		
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

Las concentraciones de ambos esteroides fueron determinadas por radioinmunoensayo y los datos están expresados como la media \pm error estándar. Modificado de Guerra-Araiza y cols. 2003.

Diestro

Es la etapa de más larga duración, entre 55 y 57 horas en la cual la rata no copula debido a que los niveles de progesterona producida por los ovarios se encuentran muy elevados, provocando la disminución del número de receptores a GnRH en la hipófisis anterior (Witcher y cols. 1984), lo que conlleva a un efecto antiestrogénico por el cual se mantiene bajos los niveles de 17- β estradiol, generando un periodo de reposo en la actividad hipofisiaria. Si no se ha producido la implantación embrionaria al final del diestro, las concentraciones de progesterona generadas por el cuerpo lúteo en regresión disminuyen e inicia un incremento en las concentraciones de 17- β estradiol proveniente de las células de la granulosa, lo que provoca la activación 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 en la rata tiene como propósito establecer contacto suficiente con un macho sexualmente experto para copular con él (Beach 1976, Erskine 1989, Micevych y Dewing 2011). Esta expresión de la conducta de estro se debe a la acción sinérgica entre el 17- β estradiol y diferentes moléculas como: P, GnRH, PGE2, 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 que caracterizan la conducta de estro han sido definidos como: atractividad, proceptividad y receptividad, los cuales se presentan durante la tarde-noche del proestro. La atractividad se define como los 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 la serie de conductas estereotipadas que la hembra despliega y que son dirigidas hacia el macho, estimulándolo a copular con ella. Las conductas proceptivas se pueden clasificar en tres tipos, a) el brincoteo (*o hopping* en inglés), el cual

consiste en pequeños saltos 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, tanto en la rata como en las hembras de otras especies de mamíferos, el patrón conductual más significativo de la receptividad sexual es la adopción de la Conducta de Lordosis (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 acompañada de la elevación de la región perigenital, seguida por un movimiento lateral de la cola (Komisaruk y Diakow 1973), que permite 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 en la rata hembra se evalúa mediante el cociente de lordosis (LQ del inglés *lordosis quotient*, Hardy y DeBold 1972, Beach 1976, Micevych y Dewing 2011), el cual resulta de dividir el número de veces que la hembra hace lordosis en diez oportunidades de ser montada por el macho entre diez y el resultado multiplicado por cien. Además, Hardy y DeBold (1972) con el fin de evaluar la intensidad de la lordosis (IL) 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 indica que tan receptiva se encuentra la hembra, pues 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

Diferentes hormonas sexuales, principalmente el 17- β estradiol y la progesterona activan a diversas estructuras cerebrales que se encuentran involucradas en el despliegue de la CL en roedores (Beach 1942, Edwards y cols. 1968, Beyer 1980). Por ejemplo, el incremento gradual en la secreción de 17- β estradiol por los ovarios durante las primeras horas del ciclo estral en la rata, alcanza su nivel máximo en la tarde del proestro (Tabla 1). Unas horas después de que ocurre el pico de 17- β estradiol, el ovario comienza a secretar, a través de las células de la teca

interna, a la progesterona, alcanzando su nivel más alto en la noche del proestro (Edwards y cols. 1968, Ichikawa y cols. 1974, Clemens y Weaver 1985) este evento coincide con el inicio de la receptividad sexual.

Por lo que se ha propuesto que el 17- β estradiol sensibiliza a las áreas cerebrales relacionadas con la expresión de la CL, como son el área preóptica media (APOm), el núcleo ventromedial del hipotálamo (HVM), sustancia gris central mesencefálica, habénula, etc., mientras que la progesterona es la encargada de disparar dicho comportamiento (Edwards y cols. 1968, Yanase y Gorski 1976, Beyer 1980). Esta idea se apoya por el hecho de 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).

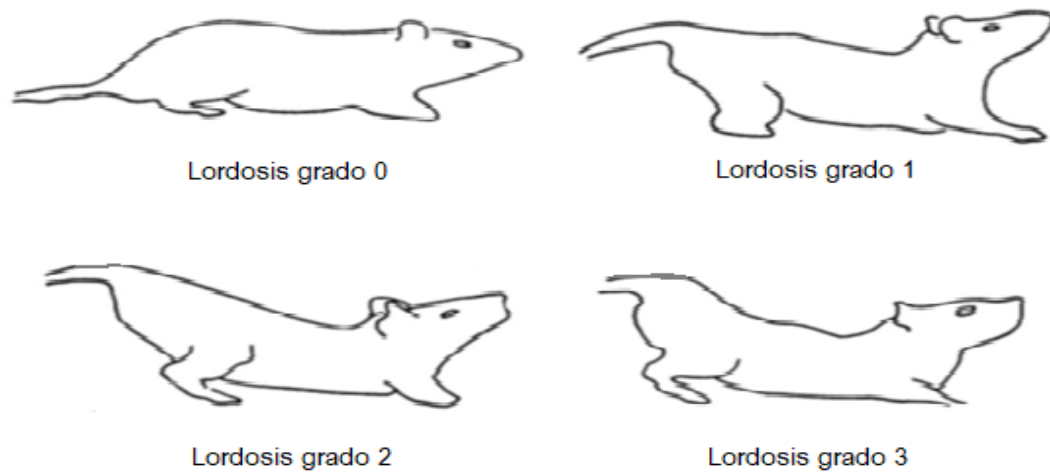


Figura 1. Escala de la intensidad de lordosis, en donde se muestran los diferentes grados de intensidad de lordosis que la ratona en estro presenta al ser montada por un macho sexualmente experto. Modificada de Hardy y DeBold (1972).

En cambio, si la OVX se realizara después de ocurrido el pico de progesterona (Moreines y Powers 1977), la rata aún manifestara CL al ser montada por el macho (Powers 1970, Clemens y Weaver 1985). Además, se sabe que la CL en las ratas OVX, puede ser inducida por la inyección de dosis repetidas de diferentes estrógenos, tal es el caso de los estudios sistemáticos realizados por Beyer y cols., en la década de los 70s (Beyer y cols. 1971, Morali y Beyer 1979), en los que 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. Por otros estudios es bien sabido que la dosis de 17- β estradiol, administrada al animal, está relacionada con la expresión de los componentes de la conducta de estro, por ejemplo, la intensidad de la dorsiflexión de la columna es mayor en relación al incremento de la dosis de esta hormona, así como también la frecuencia mostrada por la hembra de las diferentes conductas proceptivas se incrementa, aunque se considera que esto se debe mayormente a los efectos de la progesterona, (Hardy y DeBold 1972, Whalen 1974, Fadem y cols. 1977). En ratas OVX tratadas con dosis crecientes de Benzoato de estradiol (BE) la latencia de respuesta con lordosis a la monta del macho es menor en comparación con la duración y la intensidad de lordosis. (Zemlan y Adler 1977).

Si bien, la CL es facilitada por la sola administración de diferentes estrógenos a ratas (Beyer y cols. 1971) y cobayas 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 nivel obtenido con la sola infusión de estrógenos (Beach 1942, Zucker y Goy 1967, Edwards y cols. 1968). Sin embargo, para que la progesterona induzca CL es de suma 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 asegurar la producción en la síntesis de diferentes proteínas, como el RP (Parsons y cols. 1980). Por lo tanto, 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 P se administra por vía subcutánea (sc), la receptividad aparecerá entre 2 y 6 horas después (Glaser y Barfield 1984), mientras que cuando se inyecta por vía intravenosa, esta hormona (Kubli-Garfias y Whalen 1977) produce que la latencia de la lordosis sea menor y se comience a observar alrededor de los 5 a 10 minutos post-inyección

(Ross y cols. 1971, Kubli-Gárfias y Whalen 1977). Además, se sabe que cuando la P 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, cuando la administración es intravenosa la latencia de la CL es mucho mayor. En relación a esto, 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, esto debido a que los compuestos pudieron difundirse más fácilmente que cuando son 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 de los diferentes agentes lordogénicos, como la OXT.

1.4. Neuroanatomía de la conducta de lordosis

Módulo espinal

La información somatosensorial proveniente de la monta del macho a la hembra sobre la región perianal, la grupa y los flancos durante la copula (Kow y Pfaff 1979) es transmitida hacia las láminas II, V y X de los segmentos lumbar 6 y sacro 1, 2 de la médula espinal (Figura 2) (Chinapen y cols. 1992, Lee y Erskine 1996). Las contracciones vagino-cervicales desencadenan la activación de estas zonas, además de que varía dependiendo de las distintas fases del ciclo estral (Ghanima y cols. 2000), dado que las hormonas esteroides desempeñan un papel crucial en este patrón de activación nervioso (Pfaus y cols. 1996). Así, en trabajos de Komisaruk y cols. (1972), demuestran que el tamaño de los campos receptivos de las neuronas sensoriales de dichas regiones involucradas se incrementa cuando las hembras son tratadas con 17- β estradiol, debido a que las neuronas sensitivas de las astas dorsales de la médula espinal poseen RE. Además, de que 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

El tallo cerebral es indispensable para que la hembra realice con éxito la CL cuando es montada por el macho, pues la información relacionada con la expresión de la CL y su intensidad son procesadas en este módulo (Modianos y Pfaff 1976). Las estructuras activadas durante la CL en el módulo del tallo cerebral 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

estructura es la más estudiada del módulo mesencefálico, debido a que en diversos estudios se ha encontrado que es activada durante la CL (Flanagan-Cato y cols. 2006, Normandin y Murphy 2011b). Además, se sabe que la infusión de GnRH en la parte ventrolateral de esta estructura induce 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

Diversos núcleos involucrados en la inducción de la CL se encuentran localizados en este módulo cerebral. Uno de ellos, y tal vez el más importante, es el HVM (Pleim y Barfield 1988), puesto que cuando se lesiona bilateralmente se disminuye considerablemente 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. En caso contrario, la estimulación eléctrica del HVM induce la lordosis en ratas pretratadas con dosis bajas de BE (Pfaff y Sakuma 1979a). Sin embargo, ni en la estimulación eléctrica o la lesión de este núcleo cerebral se muestran efectos inmediatos, ya que son necesarios periodos de tiempo prolongados para determinar su efecto sobre la inducción o la disminución de la lordosis. Gracias a estudios de inmunocitoquímica se ha determinado la importancia del HVM en la regulación de la CL, pues 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 desencadena 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 recibe la hembra por parte del macho activan el

núcleo talámico subparafascicular parvocelular medial (Coolen y cols. 1996, Veening y Coolen 1998). De igual manera, se ha llegado a identificar diversas estructuras cerebrales que son activadas después de que se produce la CL, como es 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, Pfau y cols. 1996), así como el núcleo hipotalámico (parvo y magnocelular); (Flanagan y cols. 1993, Yang y Voogt 2002, Cameron y Erskine 2003).

El área tegmental ventral (ATV) y el núcleo habenular son centros nerviosos relacionados también con la expresión de la CL, ya que como en el HVM, los implantes de progesterona o progesterona conjugada con suero de albumina en el ATV inducen CL en el hámster y la rata (DeBold y Malsbury 1989, Frye y cols. 1996). Pues se ha reportado que, las lesiones del núcleo habenular reducen las conductas proceptivas y receptoras en ratas OVX tratadas con BE (Rodgers y Law 1967, Modianos y cols. 1975).

Módulo del cerebro anterior

Forman parte de esta región cerebral, 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, en las hembras que han sido lesionadas en esta área requieren menor cantidad de estrógenos para mostrar CL en comparación con las hembras OVX que no han sido lesionadas (Singer 1968, Powers y Valenstein 1972).

Por otro lado, los estímulos eléctricos aplicados en el APOm 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 han 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, cuando la progesterona es administrada en forma de cristales o disuelta en aceite dentro del APOm de ratas OVX pretratadas con inyecciones sc de BE se observa este mismo efecto (Rodríguez-Manzo y cols. 1986, Beyer y cols. 1988).

Otras áreas relacionadas con la disminución de la CL en diferentes especies de roedores son el septum y el bulbo olfatorio. El septum desempeña un efecto negativo en la CL en la rata, al evitar los efectos facilitatorios del HVM (Segovia y cols. 2009). Además, en la lesión eléctrica de este núcleo se observa que 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 caso del hámster, éste provoca el efecto contrario, aparentemente debido a que incrementa 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.

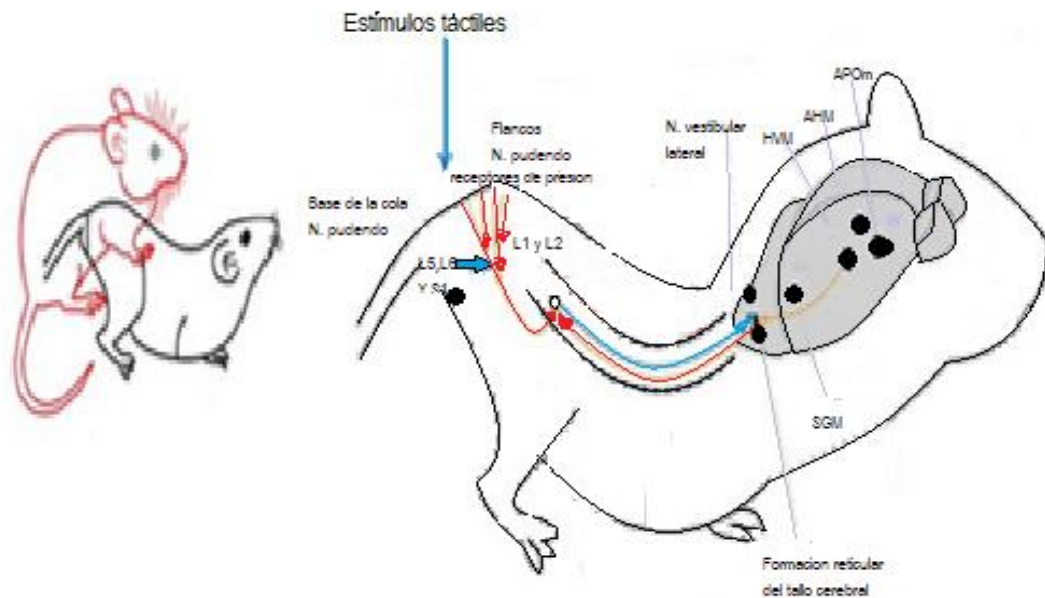


Figura 2. Esquema de la conducta de lordosis en donde se muestra la integración de las señales sensoriales recibidas en la hembra por la monta del macho y las de áreas del hipotálamo tales como el HVM y el APOm por acción del 17B estradiol y la progesterona, facilitando la señalización descendente de motoneuronas responsables de la contracción de los músculos longissimus lateralis y transversus espinal-lumbar produciéndose la dorsiflexión de la lordosis (Pfaff y col. 1994).

1.5. El receptor intracelular a progesterona

El RP es una proteína a través de la cual la progesterona ejerce sus efectos (Blaustein y Feder 1979, O'Malley y cols. 1991). Las primeras caracterizaciones, así como la distribución tisular de este receptor se realizaron gracias a la utilización de la progestina sintética R5020 (17, 21-dimetil-19-nor-2,9-pregnandien-3-20 diona), la cual se sabe que se disocia más lentamente del RP que la propia progesterona (Philibert y cols. 1977) y así forma un complejo hormona-receptor más estable. El uso del 3HR5020 permitió detectar 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). En el caso del sistema nervioso central, el RP no sólo ha sido detectado en las neuronas, sino también en células gliales, principalmente los oligodendrocitos (Jung-Testas y cols. 1992). Se han descrito dos poblaciones del RP en el sistema nervioso central de roedores gracias al uso de técnicas bioquímicas e inmunocitoquímicas (MacLusky y McEwen 1978), una de las cuales se localiza en el hipotálamo, esta es regulada por estrógenos, y la otra, mayormente distribuida en la amígdala, cerebelo y corteza cerebral (MacLusky y McEwen 1980, Camacho-Arroyo y cols. 1994) no modificada por estrógenos. Además, se conoce que los estrógenos inducen la síntesis del RP en varios tejidos (MacLusky y McEwen 1978, Kastner y cols. 1990) pues se ha detectado un aumento considerable en las concentraciones del RP en el útero a las 24 horas después de haber administrado BE a cobayos OVX. Sin embargo, no existe una relación directa entre la expresión del gen y la síntesis del RP en respuesta a 17- β 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 al unirse a la progesterona, forma un complejo hormona-receptor activo que se puede translocar hacia el núcleo (Blaustein y Feder 1980, McGinnis y cols. 1981, Rainbow y cols. 1982) para unirse a la cromatina y modificarla (Perrot-Appianat y cols. 1986, Mani y Portillo 2010).

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

Recientemente, estudios *in vitro*, reportan 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 presenta las mismas propiedades fisicoquímicas que los receptores clásicos de esteroides, como son; alta afinidad, saturabilidad y especificidad, 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).

Gracias a la clonación y caracterización de los ADNs complementarios de cada uno de estos tipos de receptores, sabemos que en el RP humano y del pollo (Conneely y cols. 1987, Misrahi y cols. 1987) hay diferentes regiones del receptor como: a) el **dominio de unión al ADN**, que muestra de 99-100% de conservación entre los receptores a esteroides y consta de 70 aminoácidos aproximadamente, en el cual se localizan dos pliegues de aminoácidos denominados dedos de zinc. b) el **dominio de unión del ligando**, este contiene aproximadamente 250 aminoácidos y se ubica en el extremo carboxilo terminal de la molécula. Este dominio es el sitio de unión con la hormona, además es importante mencionar que es esta región en donde se llevan a cabo 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 se localiza entre el dominio de unión al ligando y el dominio de unión al ADN, y es en donde se encuentran las señales de localización nuclear; d) la **región del amino terminal**, es una zona con gran variación en tamaño y composición de aminoácidos de entre los receptores a esteroides. Aquí es donde se llevan a cabo la mayoría de las fosforilaciones que se producen

en el receptor, especialmente en los residuos de serina (posiciones 102, 294, 345) por diferentes proteínas cinasas, incluyendo la MAPK 14 (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).

1.5.2. El receptor a progesterona como una fosfoproteína

Para llevar a cabo la fosforilación de proteínas es necesaria la incorporación de grupos fosfato a los residuos de aminoácidos que contienen en su cadena lateral radical hidroxilo (OH), como es el caso de la serina, treonina y tirosina. Un ejemplo son los receptores de esteroides, pues como la mayoría de las proteínas muestran esa característica y pueden ser fosforilados en numerosos sitios en los que se localicen dichos aminoácidos, por lo que se han clasificado como fosfoproteínas, que al ser fosforiladas sufren modificaciones covalentes que provocan la regulación de la mayoría de los procesos metabólicos.

Cuando el RP es fosforilado se desencadenan 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.

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

Se sabe que con la administración de estrógenos se induce la expresión de RP en las áreas cerebrales involucradas con la expresión de la CL en roedores (HVM y APOm) (MacLusky y McEwen 1978, McEwen y cols. 1978, Moguilewsky y Raynaud 1979, Etgen 1984). Múltiples estudios se han llevado a cabo sobre 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, si se alarga 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. Por lo que se realizaron estudios con la utilización del 3HR5020, como marcador de unión con el RP (Parsons y cols. 1982), y se encontró que el inicio y la desaparición de la CL inducida por progesterona coincidía con la aparición y desaparición del RP después del implante y la remoción de 17- β estradiol respectivamente. Sin embargo, otro estudio realizado por Blaustein y Feder (1980) 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 provocan la translocación de los RP del citoplasma hacia el núcleo celular de las neuronas del APOm y del HVM. Así es como, 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).

Para poder demostrar la participación de RP en diferentes procesos reproductivos se han utilizado oligonucleótidos antisentido. Estos compuestos actúan a través de diferentes mecanismos de acción, por un lado, pueden 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, entonces la inyección de estos compuestos directamente en el HVM de hembras OVX, disminuye significativamente la CL inducida por progesterona (Pollio y cols. 1993). 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. Además, 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, tanto los oligonucleótidos antisentido como los sentidos para la secuencia de ADN que codifica al ARNm para la síntesis de RP directamente en el tercer ventrículo de ratas pretratadas con estrógenos, encontrando que tanto la proceptividad como la receptividad inducida por progesterona fueron disminuidas en animales tratados con oligonucleótidos antisentido. No así en los animales que recibieron el oligonucleótido sentido que continuaron expresando CL normal. Es decir que presentaron 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 (5 α -DHP y 5 β , 3 β -Pgl). Los resultados indican que existe 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).

1.6 Oxitocina

La OXT es una hormona peptídica conformada por nueve aminoácidos (Fig. 3), con un peso molecular de 1007 Daltons (Du Vigneaud y cols. 1953), su liberación ocurre en el núcleo supra óptico (NSO) por las neuronas magnocelulares que proyectan sus axones hacia el

interior de la neurohipófisis y por las pequeñas proyecciones axonales de las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular (NPV), las cuales inervan a la amígdala, el hipocampo, el núcleo accumbens y el septo lateral. (Flores-Acevedo 2016., Ross y cols.2009).

La OXT al igual que diversos neurotransmisores como el glutamato, ácido Gamma-aminobutírico (GABA), etc., se encuentra almacenada junto con su molécula transportadora (neurofisisina) en pequeñas vesículas que son liberadas por estímulos eléctricos al espacio sináptico, pero a diferencia de otros neurotransmisores, la OXT se puede difundir a través del espacio extracelular (Ross y cols. 2009). Esta hormona participa en diversos procesos reproductivos (conducta sexual femenina y erección del pene), conductuales (comportamientos sociales en mamíferos e interacciones sociales) y fisiológicos (contracción uterina, eyección de la leche), (Gimpl y Fahrenholz 2001). A nivel reproductivo la OXT juega un papel importante en la regulación de la conducta sexual en hembras y machos (Lee y cols. 2009), además facilita la maduración sexual a través de la estimulación de la secreción pulsátil de GnRH (Yamanaka y cols. 1999, Bourguignon y cols. 1992) y la respuesta de lordosis en la rata hembra (Arletti y Bertolini 1985) en machos, la OXT se encuentra involucrada con la erección del pene, la actividad copulatoria y la eyaculación (Pfaus 2009), además del desarrollo del área perineal (Veening y cols.2015), de igual manera estimula la contracción uterina durante el parto y la eyección de leche (Caldeyro y Poseiro 1959).

En el caso de humanos, la OXT facilita el transporte de espermatozoides y óvulos debido a que participa en el aumento en la contractilidad de los músculos involucrados en este proceso (Pfaus 2009). Además, estudios actuales demuestran que la OXT contribuye al deseo sexual y la expectativa de recompensa en la mujer (Pfaus 2009).

A nivel conductual, la OXT facilita el comportamiento parental y afiliativo (Olazábal y cols. 2013, Lim y Young 2006, Uvnas-Moberg 1998), ya que diversos estudios muestran que el comportamiento maternal en la mayoría de los mamíferos es inducido por cambios hormonales que ocurren al final de la gestación y al inicio del parto, periodo que coincide con un incremento en los niveles de estrógenos y OXT en sitios específicos del cerebro (Lim y Young 2006, Bridges 1996) área preóptica media y núcleo ventral de la *estria terminalis* (Numan y cols. 1977, Numan y cols. 1985).

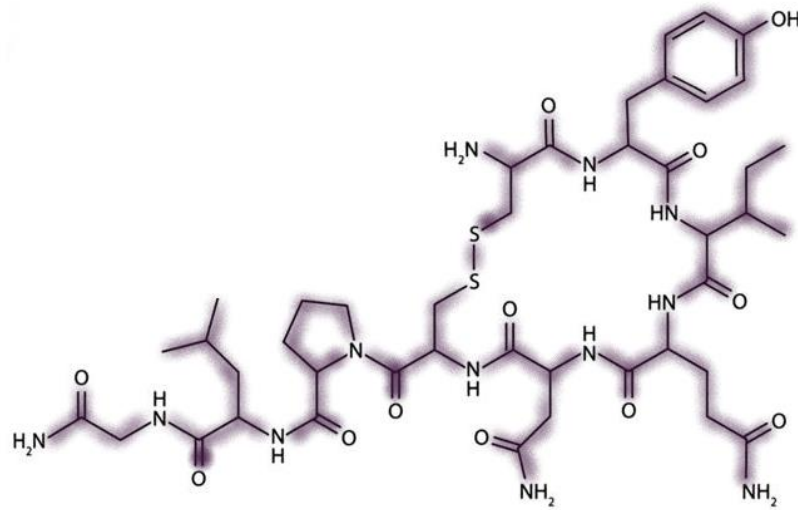


Figura 3. Estructura de la molécula de OXT. Modificado de Churchland, P. (2012).

1.6.1 El receptor de Oxitocina

Actualmente, solo se ha caracterizado un tipo de receptor de OXT el cual pertenece a la clase I de la familia de los receptores acoplados a proteínas G, éste se encuentra compuesto por 389 aminoácidos distribuidos en siete dominios transmembranales (Fig. 4) (Manning y cols. 2012). Por su localización se pueden dividir en dos grupos: a) los que se localizan en el SNC, de los que se subdividen en receptores transitorios y receptores permanentes (Lee y cols. 2009) y b) los que se localizan en el SNP ubicados en órganos como el útero, placenta, glándula mamaria, amnios, corazón, páncreas e hígado (Flores- Acevedo. 2016). Se sabe que el gen que codifica para este receptor posee 3 intrones y 4 exones: Los exones 1 y 2 contienen la región no codificante 5', los exones 3 y 4 contienen el aminoácido codificante del receptor de oxitocina, el intron 3 separa la región codificante después del dominio 6 y el exón 4 contiene la secuencia codificante del séptimo dominio, el COOH y la región no codificante 3' (Gimpl y Fahrenholz 2001). La regulación del gen que codifica para el receptor a OXT esta correlacionada con el nivel de esteroides sexuales, específicamente el estradiol, dado que en estudios anteriores las ratas OVX bajo administración de estrógenos mostraban un incremento de los sitios de unión del receptor OXT, de igual forma se sabe que la expresión del receptor a estrógenos no está presente en las neuronas productoras de OXT conocidas como

magnocelulares, pero si hay una respuesta a estrógenos en las neuronas parvocelulares ya que estas presentan el receptor de estrógenos β .

Sin embargo, la sobre estimulación de los receptores de oxitocina provoca una desensibilización del receptor, la cual ocurre por fosforilación y la posterior unión a la arrestina (Gerald y cols. 2001).

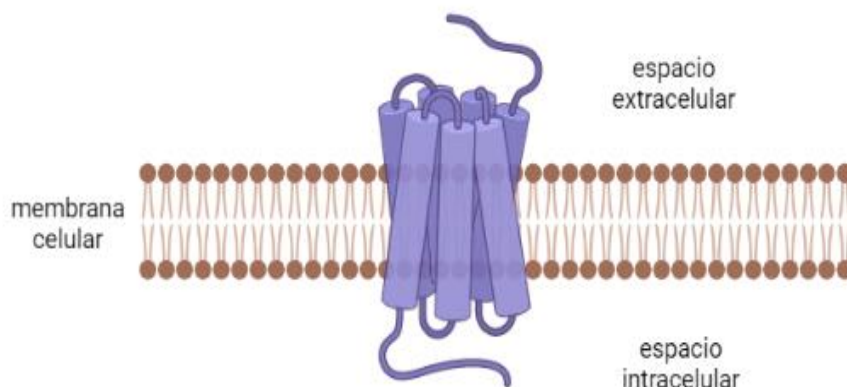


Figura 4. Estructura esquemática del receptor de OXT en el que se muestran los 7 dominios transmembranales. Modificado de Zingg y Laporte (2003).

Además, se ha demostrado que las neuronas productoras de OXT ubicadas en los astrocitos participan en la liberación de GnRH, ya que se encontró que la expresión de receptores de OXT eran abundantes en astrocitos hipotalámicos y ausentes en las neuronas GnRH (Panatier 2009), esto lleva a pensar en la posibilidad que OXT podría actuar de manera indirecta sobre la liberación de GnRH, a través de los astrocitos para inducir la liberación de PGE2, ya que se ha demostrado la presencia de receptores de PGE2 en las neuronas liberadoras de GnRH (Anne-Simone y cols. 2008).

La OXT liberada de la neurohipófisis hacia el líquido cefalorraquídeo y al sistema porta llega a los receptores localizados en los astrocitos hipotalámicos provocando la síntesis de PGE2, la

cual después de ser sintetizada, por las células gliales, se difunde rápidamente para unirse y activar receptores específicos de prostanoïdes E (EP) los cuales se encuentran ubicados en las neuronas GnRH (Sharif y cols. 2013).

1.6.2 Atosiban

Es un nonapéptido análogo de OXT considerado como antagonista, cuya fórmula es d [D. Tyr (Et) 2, Thr 4] OVT (Manning y cols. 2012) estructuralmente es similar a la molécula de OXT con modificaciones en las posiciones 1, 2, 4 y 8 (Fig. 5). El extremo N del residuo de cisteína se desamina para formar ácido 3-mercaptopropánico en la posición 1, en la posición 2 la L-tirosina se modifica a D-tirosina con un grupo etoxi que reemplaza al fenol, la treonina reemplaza a la glutamina en la posición 4 y la ornitina reemplaza leucina en la posición 8 (National Center for Biotechnology Information., 2022). con alta afinidad por los receptores de OXT de metabolismo rápido, el cual actúa sobre el bloqueo de los receptores de OXT y que tiene como consecuencia la ausencia de la manifestacion de la conducta sexual en hembras (Pederson y Boccia 2002).

El mecanismo de acción de este fármaco se debe a que actúa por competencia con OXT por sus receptores, lo que conlleva a la inhibición de la activación de la vía mediada por OXT (Shubert, 1995). Adema Phaneuf y cols. 1994 mencionan que el uso de atosiban para evitar el trabajo de parto prematuro en humanos ha sido exitoso ya que atosiban se une a los receptores de oxitocina unidos a la membrana en el miometrio evitando los estímulos provocados por la OXT en la producción de trifosfato de inositol inhibiendo así la liberación de calcio y la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje y como consecuencia final la disminución en la frecuencia de las contracciones (Phaneuf y cols.1994).

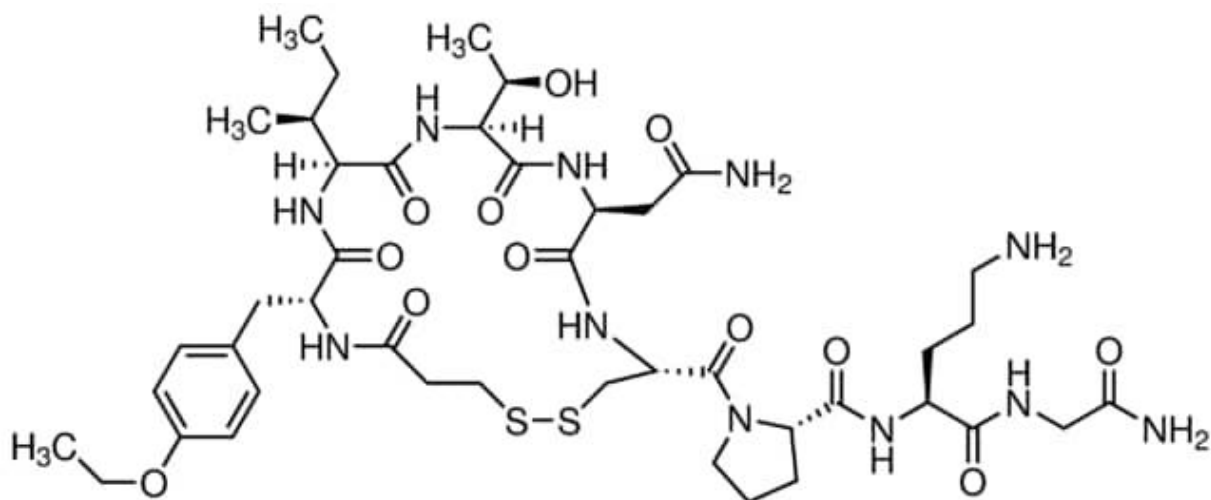


Figura 5 Representación esquemática de la molécula de atosiban. Modificado de Manning y cols. (2012).

1.6.3 PGE2

La prostaglandina E2 (PGE2), es una hormona lipídica (Fig. 6) que participa en la activación de la receptividad sexual femenina, la cual al ser la hormona liberada desde los astrocitos hipotalámicos provoca la liberación de GnRH (Rodríguez- Sierra y Komisaruk 1977). Esta hormona se sintetiza a partir del ácido araquidónico y del ácido linoleico. Por lo tanto, una vez que este aminoácido es liberado desde la membrana celular, es transformado en prostanoïdes por la acción de las enzimas ciclooxigenasa 1 (COX-1), distribuida en la microglía, hipocampo y neuronas corticales cerebrales, (Deininger y Schluesener 1999) y ciclooxigenasa 2 (COX-2), localizada en la corteza cerebral e hipocampo (Yamagata y cols. 1993). Su biosíntesis ocurre en tres etapas (Smith y cols. 2000); 1) La oxidación del ácido araquidónico para formar una estructura cíclica; PGG2, 2) La peroxidación de la PGG2 para originar a la PGH2 que posteriormente se convierte en los prostanoïdes activos: PGD2, PGF2 α y PGE2, estos últimos son los encargados de interactuar con los receptores EP1, EP2, EP3 y EP4 localizados en neuronas liberadoras de GnRH. Este último evento facilita la liberación de GnRH a través de distintas vías de señalización que dependen de la expresión del receptor acoplado a proteína G (Baba y cols. 2001). Durante la activación del receptor EP1 unido a Gq se desencadena un aumento de Ca⁺ libre intracelular (Sugimoto y Narumiya 2007), lo que

provoca que los receptores EP2 y EP4 acoplados a Gs activen a la adenilato ciclasa ocasionando un aumento en los niveles intracelulares de AMPc (Sugimoto y Narumiya 2007, Clasadonte y cols. 2017). Al contrario, en el caso de la activación del receptor EP3 disminuye los niveles de AMPc a través de la inactivación de la adenilato ciclasa (Sugimoto y Narumiya 2007, Clasadonte y cols. 2017).

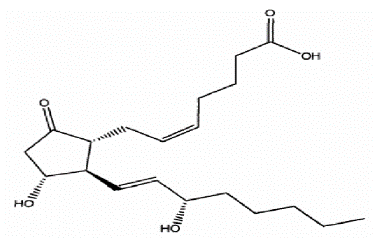


Figura 6. Representación esquemática de la molécula de prostaglandina. Modificada de Fernández Piqueras y cols. (2012)

1.6.4 Ácido acetilsalicílico (aspirina)

El ácido acetilsalicílico es químicamente un éster acetilado formado por la asociación de una porción de acetilo y una de salicilato (Fig.7), es una de las sustancias más conocidas perteneciente a la familia de los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) que interfiere con la síntesis de prostanoides, al inhibir a ambas isoformas de la COX (Hyun y cols. 2011). Esta sustancia ejerce efectos analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios dependientes de la dosis administrada a nivel sistémico los cuales se deben a la inhibición de la biosíntesis de PGE2 (Borriello, Stasi, 2013) dependientes de enzimas como COX-1 y COX-2 y gracias a trabajos recientes fue que se demostró por primera vez que el ácido acetilsalicílico se une a factores de transcripción en la región promotora de la COX-2 para lograr el efecto de inhibición (Schrör, K.2009)

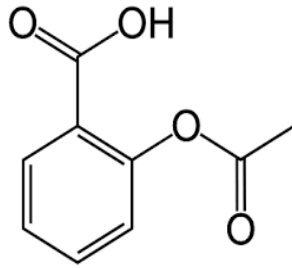


Figura 7. Molécula de ácido acetilsalicílico (aspirina). Modificado de Hyun y cols. (2011).

1.6.5 Receptores EP4 de PGE2

Los receptores de prostanoïdes pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G, están constituidos por siete dominios transmembranales (Fig. 8). El receptor EP4 tiene una estructura compuesta por 488 aminoácidos (Regan 2003). Algunas propiedades del receptor EP4 de PGE2 radica en la presencia de un residuo aspartato en el segundo dominio transmembrana, el cual determina la interacción del receptor- ligando (Savarese y Fraser, 1992). Otra propiedad compartida con la familia de receptores EP es la presencia de un par de residuos de cisteína conservados en el segundo y tercer dominio extracelular el cual forma un enlace disulfuro para mantener la estabilización de conformación del receptor. (Savarese y Fraser, 1992).

Además, existe otra característica de los receptores de prostanoïdes los cuales presentan un residuo de arginina en el séptimo dominio transmembrana, el cual podría ser el sitio de unión del prostanoïdes (Narumiya et al., 1999). Esta arginina presente en todos los receptores EP4 de diferentes especies animales como el ratón, rata, perro, conejo, pollo, y el pez cebra, lo que sugiere su origen ancestral durante la evolución.

Sin embargo, Regan demostró diferencias particulares en los dominios intracelulares del receptor EP4 con respecto a los otros receptores, por ejemplo, el receptor EP4 posee un carboxilo terminal intracelular rico en serina y treonina más largo que el que presenta el receptor EP2 (148 frente a 40). Además, hay una inserción de 25 aminoácidos en el tercer bucle intracelular en EP4, pero no en EP2 (Regan, 2003). También se sabe que el receptor EP4 se encuentra unido con una proteína estimuladora (Gs) y por lo tanto una vez que este receptor se une a su ligando, puede activar al adenilato ciclase, hecho que aumenta la formación de

AMPC (Coleman y cols. 1994, Nishigaki y cols. 1996) y que se sabe que esta molécula está involucrada en la liberación de GnRH y como consecuencia la manifestación de la conducta de lordosis en la rata.

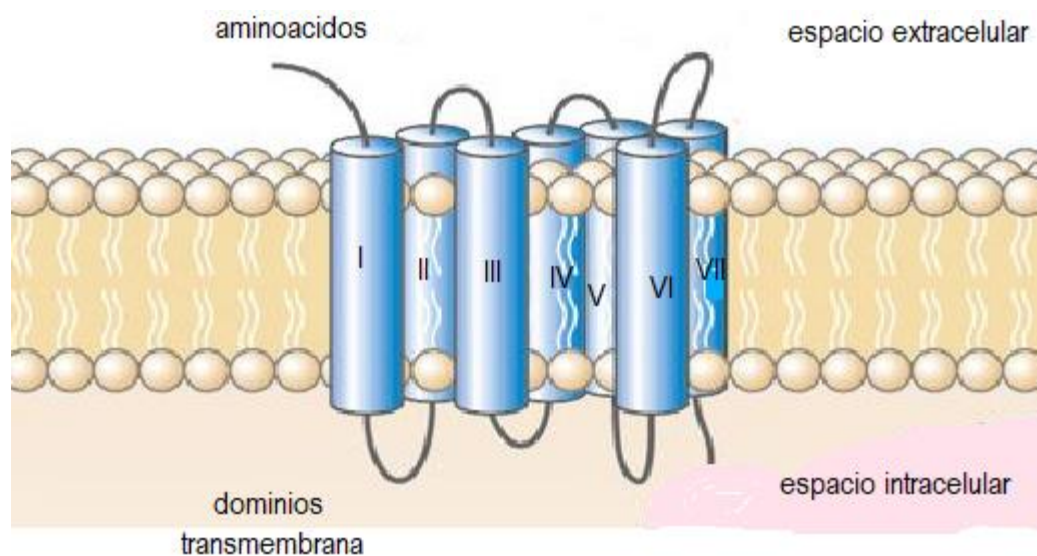


Figura 8. Estructura del receptor EP4 de PGE2, donde se muestran los siete dominios transmembranales. Modificado de Regan (2003).

1.6.6 ONO-AE3-208

El ONO-AE3-208 es un ácido cuya fórmula es Ácido 4-[4-ciano-2-[2-(4-fluoronaftalen-1-il)propanoilamino]fenil]butanoico con un peso molecular de 404.4 g/mol (Fig. 9) (Centro Nacional de Información Biotecnológica, (2022)). Es el antagonista específico de los receptores EP4 de prostaglandinas, estudios demuestran que disminuye los niveles intracelulares de AMPC ocasionando una disminución en la expresión de la CL (Xu y cols. 2014).

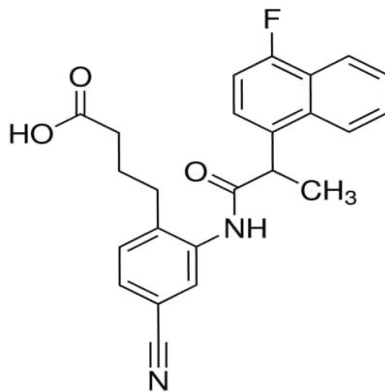


Figura 9. Esquema de la molécula de ONO-AE3-208. Modificado de Centro Nacional de Información Biotecnológica, (2022)

1.6.7 Hormona liberadora de Gonadotropina (GnRH)

GnRH es una hormona peptídica integrada por 10 aminoácidos (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂; (Flanagan y cols.1997). Esta hormona es sintetizada por las neuronas productoras de GnRH localizadas en el hipotálamo basal y regiones adyacentes (Schiavi y cols. 1963), las cuales envían sus proyecciones a la eminencia media, sitio donde se unen con el sistema porta hipófisis en donde GnRH es liberada al torrente circulatorio y así llegar a sus receptores GnRH-1 ubicados en la neurohipófisis para estimular la liberación de la hormona foliculoestimulante y hormona luteinizante, (LH y FSH) además de que el ritmo pulsátil que caracteriza la liberación de GnRH determina el nivel circulante de ambas hormonas (Knobil 1980). La forma biológicamente activa de la molécula de GnRH contiene una curvatura central, por lo que sus extremos carboxi terminal y amino terminal (Fig. 10) activan el receptor de GnRH. (Flanagan y cols., 1997)

Estudios sobre la estimulación de las neuronas GnRH determinan que estas carecen de receptores de estradiol, por lo tanto, es necesario que otras neuronas estimulen su secreción. (Roa y Tena 2007).

Se sabe que en mamíferos existen dos subtipos de receptores de GnRH, I y II; sin embargo, el tipo I es el que participa en la expresión del comportamiento sexual femenino (Brownstein y cols. 1980).

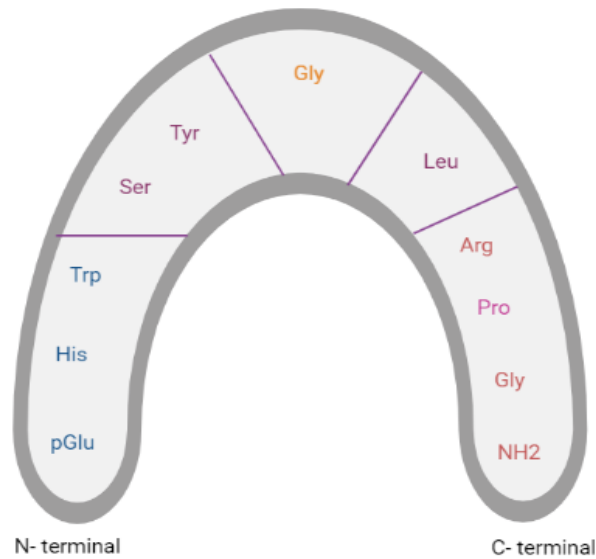


Figura.10. Molécula de GnRH, donde se muestra la curvatura central, y sus extremos amino y carboxilo terminal. Modificada de Flanagan y cols. (1997).

1.6.8 Receptor de GnRH

Como se mencionó anteriormente, GnRH es la hormona hipotalámica fundamental que regula la conducta sexual y la reproducción. Dicha hormona presenta las secuencias NH₂ y COOH terminal, que son necesarios para la unión y activación del receptor. En el caso de los mamíferos este receptor presenta dos isoformas, GnRH-I y GnRH-II, sin embargo, es el receptor GnRH-I el encargado de la liberación y regulación de la gonadotropina. (Sealfon et al., 1997). El receptor GnRH-1 presenta las características de los receptores acoplados a proteína G (GPCR), en donde el dominio NH₂- terminal es seguido de siete dominios transmembrana unidos por tres dominios de bucle extracelular y tres dominios de bucle intracelular, se sabe que los dominios extracelulares (Fig. 11) se encuentran asociados a la propagación de la señal para la activación del receptor, mientras que los dominios intracelulares se encargan de la interacción con las proteínas G para la transducción de señales al interior de la célula. (Millar, 2004).

La señal hormonal que activa al receptor GnRH-1 implica un cambio conformacional del receptor (Kenakin, 1993). que desencadena la formación de un complejo receptor- proteína G,

y en el momento que GTP se une a la proteína G, el receptor vuelve a la conformación de baja afinidad y el complejo se disocia. (De Lean et al., 1980)

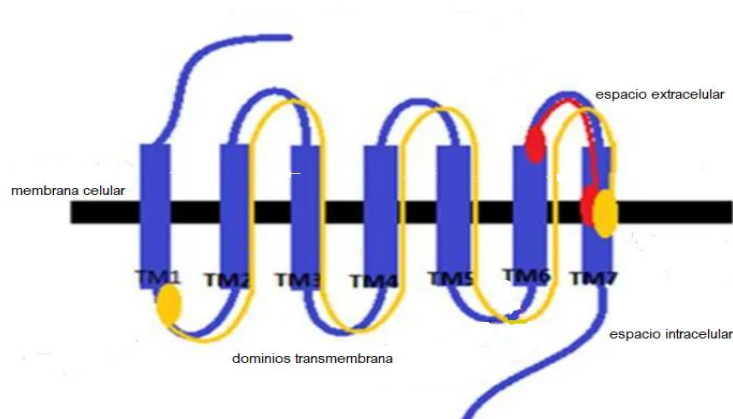


Figura 11. Representación esquemática del receptor de GnRH, Tipo 1, donde se muestran sus 7 dominios transmembrana. Modificado de Millar, (2004).

1.6.9 Antide

Antide es un antagonista de tercera generación de los receptores GnRH-1 (Fig. 12) que bloquea la conducta de lordosis. (Domínguez-Ordoñez y cols. 2018). Dado que la liberación de GnRH es un suceso importante para la manifestación de la CL, la inhibición de la unión de esta hormona con su receptor evita la expresión de dicho comportamiento (Brownstein y cols. 1980).

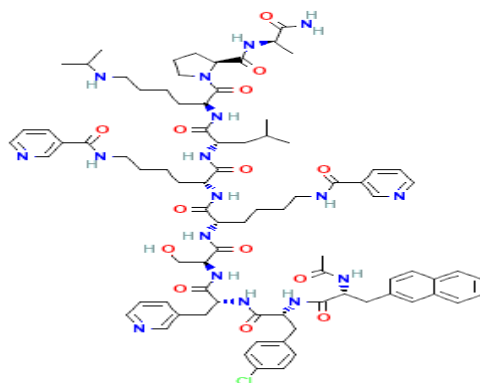


Figura 12. Molécula del antagonista del receptor GnRH-1, antide. Modificada de Brownstein y cols. (1980).

2. ANTECEDENTES

Es normalmente aceptado que el comportamiento sexual femenino tanto en ratas intactas con ciclo estral normal, como en ratas ovariectomizadas, es producido por la existencia de concentraciones adecuadas de niveles de estradiol, seguido horas después por progesterona. Por otra parte, una serie de estudios farmacológicos, realizados inicialmente con agentes no esteroideos tales como la hormona liberadora de gonadotropinas y PGE2 demostraron que podían facilitar la expresión del comportamiento de lordosis en ratas ovx pretratadas con E2. Subsecuentemente, otros compuestos con diferente estructura química pueden sustituir a la P para inducir comportamiento de lordosis cuando son inyectadas a ratas pretratadas. Estas drogas incluyen, neurotransmisores como noradrenalina, dopamina, GABA, acetilcolina, pequeños péptidos como oxitocina, prolactina, leptina y nucleótidos cíclicos como AMPc y GMPc.

Debido a la diversidad de la estructura química presentada por estos agentes, se pudiera proponer que diferentes mecanismos de acción podrían estar envueltos en la regulación del comportamiento de lordosis, además del hecho de que ninguno de estos agentes mostro afinidad por el receptor de estrógeno (RE) o el receptor de progesterona (RP) o las complejas redes neuronales involucradas en la regulación del comportamiento sexual femenino usando estos agentes. Sin embargo, las características temporales ejercidas por estos agentes sobre la latencia del comportamiento de lordosis mostro similitudes a los efectos generados por E y P, un fenómeno que sugiere que el mismo mecanismo de acción celular es producido por varios componentes. Ya que varios agentes de los antes mencionados son conocidos al actuar sobre sus propios receptores localizados sobre la membrana celular, acoplados a proteínas G y generando la cascadas de activación de segundos mensajero, una serie de experimentos fueron realizados para explorar el mecanismo celular por el cual estos agentes regulan la expresión del comportamiento sexual femenino en ratas pretratadas con E. por ejemplo la participación del receptor GnRH en el comportamiento de lordosis inducida por alguno de estos agentes. Así la administración intracerebroventricular del inhibidor del receptor GnRH-1, Antide, reduce el comportamiento de lordosis inducido por el mismo GnRH, progestinas, leptina, estradiol solo o la estimulación vagino-cervical. Por otro lado, varias proteínas cinasas han

sido evaluadas, por ejemplo, la administración intracerebral del inhibidor RpAMPS de PKA, el inhibidor PD98059 de MAPK, el inhibidor KT5823 de PKG, reducen la lordosis inducida por progestinas, GnRH, PGE2, leptina etc.

Inicialmente una serie de experimentos realizados por Caldwell y Cols. (1983), mostraron que oxitocina facilita la lordosis cuando se inyecta intracerebralmente, en el hipotálamo ventromedial o el área preóptica, un efecto mediado por el receptor de OXT, o por el DNA antisentido del receptor de OXT, reducen el comportamiento de lordosis, además en ratas receptivas tratadas con E y P, la administración de atosiban, un antagonista de OXT, reduce significativamente el reflejo de lordosis. Ahora se ha demostrado que OXT es un potente estimulador tanto de PGE2 como de GnRH del sistema APO- hipotálamo. En apoyo a esta idea es que tanto OXT y sus receptores incrementan en estas áreas cerebrales en la pubertad y subsecuentemente en la noche del día del estro. Sin embargo, se propuso que OXT podría tener un efecto indirecto sobre la liberación de GnRH ya que las neuronas liberadoras de GnRH no expresan receptores de OXT, lo que podía sugerir que el efecto estimulante de la OXT sobre las neuronas requeriría estar mediado por otro sistema. Así, experimentos realizados inicialmente por Ojeda y cols. Mostraron que las prostaglandinas eran sustancias neuroactivas que regulaba la secreción de LH. El efecto de PGE2 se puede ejercer sobre cuatro subtipos de receptores (EP1 a 4) acoplados a proteínas G capaces de activar la formación de varios segundos mensajeros.

Por ejemplo, la activación del receptor EP1 por PGE2 induce un aumento de Ca² libre intracelular, mientras que la activación de EP2 y EP4 activan las proteínas Gs, lo que provoca un aumento en los niveles intracelulares de AMPc. Interesantemente estudios recientes apoyan la idea de que los receptores de OXT ubicados en la membrana de los astrocitos hipotalámicos, cuando son activados por OXT, inducen la síntesis de PGE2. Como se mencionó anteriormente, esta hormona actúa como un fuerte inductor de la liberación de GnRH. Por lo tanto, en el presente trabajo planteamos la hipótesis de que el comportamiento de la lordosis inducida por OXT es a través de la activación de la vía OXT/PGE2/GnRH.

3. JUSTIFICACIÓN

Se conoce que la CL en la rata es producida por la acción sinérgica entre el estradiol y una serie de compuestos no esteroideos como la OXT, PGE2 y la GnRH. Estos compuestos actúan en neuronas ubicadas en el HVM y APOm y que ahora se sabe que tienen una estrecha interacción entre las células gliales y las neuronas liberadoras de GnRH; pero no se ha estudiado si esta vía intracelular podría estar involucrada en la facilitación de la CL. Los compuestos, que se piensa que estarían participando en esta interacción son: la oxitocina, la PGE2, así como la GnRH, y sus respectivos receptores, además del RP.

Como ya fue mencionado, la OXT es una hormona capaz de inducir la CL, sin embargo, no existen datos que muestren la localización de los receptores de OXT sobre las neuronas liberadoras de GnRH: pero sí en los astrocitos. Esto plantea la posibilidad de que exista una interacción entre las células gliales y las neuronas liberadoras de GnRH y que la síntesis y liberación de PGE2 por OXT, desde los astrocitos, sea la hormona que provoca la liberación de GnRH. Una vez liberada GnRH, podría activar componentes intracelulares, como a las proteínas cinasas que podrían activar a los RPs. Por lo tanto, estudiar la interacción OTX/PGE2/GnRH, y su participación en el despliegue de la CL en la rata nos permitirá inferir la interacción entre las neuronas y los astrocitos.

4. HIPOTESIS

La conducta de lordosis inducida por oxitocina se produce a través de la síntesis de Prostaglandina E2, probablemente desde los astrocitos y la liberación de GnRH en la rata ovariectomizada previamente tratada con benzoato de estradiol.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General.

Explorar si la CL inducida por OXT involucra la síntesis de la PGE2 y la activación de los receptores de GnRH.

5.2. Objetivos específicos.

1. Evaluar si los receptores de oxitocina participan en el despliegue de la conducta de lordosis inducida por oxitocina, a través de la administración del atosiban, antagonista de dicho receptor.
2. Determinar si la síntesis de PGE₂, participa en la conducta de lordosis inducida por oxitocina administrando aspirina, inhibidor de la COX, enzima encargada de la síntesis de prostaglandinas.
3. Evaluar si la conducta de lordosis inducida por oxitocina es a través de los receptores EP-4 de PGE₂, a través de la administración icv del antagonista ONO-AE3-208.
4. Evaluar si la conducta de lordosis inducida por oxitocina es mediada por los receptores GnRH-1, a través de la administración del antagonista Antide.

6. METODOLOGÍA

Se utilizaron ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley, con un peso de entre 200 y 250 g al iniciar los experimentos. Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$), con un ciclo de luz-oscuridad invertido, fueron alimentadas con nutricubos Purina (Purina, México) y agua a libre acceso. Para las diferentes cirugías, las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de xilazina (4 mg/kg) y ketamina (80 mg/kg) vía intraperitoneal.

6.1 Ovariectomía

Los animales, previamente anestesiados, fueron OVX bilateralmente, para ello fueron rasuradas en el abdomen desde el xifoideas hasta el pubis, enseguida se desinfecto dicha región con cloruro de benzalconio al 5 % y se realizó una incisión de aproximadamente 1 cm de longitud a la altura de la línea media, enseguida se ubicó el cuerno uterino derecho y apoyados de un ligero tirón se extrajo el ovario, enseguida se ligó el cuerno uterino con sutura de seda del No. 2 y posteriormente se cortó el ovario, se realizó el mismo procedimiento para la extirpación del ovario izquierdo, enseguida los cuernos uterinos fueron recolocados dentro de la cavidad abdominal para continuar con la sutura de la capa muscular con sutura de algodón

del No. 2 y utilizando sutura con punto en “U”, mientras que la piel fue suturada igualmente con un punto en “U” pero con hilo de seda No. 2, posteriormente, con la finalidad de prevenir infecciones y disminuir el dolor, los animales recibieron bencilpenicilina procaínica a una dosis de 22000 UI y bencilpenicilina cristalina a una dosis de 7500 UI c/24 horas x 3 días i.m., además Carprofeno 5 mg/kg c/24 horas x 3 días por vía sc respectivamente.

6.2 Implantes intracerebroventriculares

Las ratas OVX fueron anestesiadas con una mezcla de xilazina (4 mg/kg) y ketamina (80 mg/kg) inyectada vía intraperitoneal y colocados en un instrumento estereotáxico Kopf (Tujunga, CA. USA) con el propósito de implantarlas con 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; antero-posterior + 0.80 mm, mediolateral-1.5 mm, dorsoventral -3.5 mm respecto a bregma).posteriormente se colocó un tornillo de acero inoxidable dentro de la cánula con la finalidad de evitar alguna obstrucción o contaminación en el interior de esta, finalmente se suturo la piel con puntos separados con el uso de un hilo de seda del No. 2, además, para disminuir el dolor y prevenir infecciones los animales recibieron los fármacos mencionados en la sección de OVX.

Todos los procedimientos metodológicos y los cuidados postoperatorios a los cuales fueron sometidos los animales son realizados de acuerdo con los estatutos que establecen la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

6.3 Conducta de Lordosis

Para evaluar la conducta de Lordosis (CL) las hembras fueron colocadas dentro de arenas circulares de plexiglás de 60 centímetros de diámetro con machos sexualmente expertos, y observando esta conducta a los 30, 120 y 240 minutos después de la administración de la OXT. Las pruebas duraron hasta el momento en que las hembras recibieron diez montas vigorosas por parte del macho y la receptividad sexual fue evaluada a través de dos parámetros, 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) (Hardy y De Bold 1972). Para lo cual quien observe se basará en la clasificación propuesta por Hardy y De Bold 1971 (21), la cual es:

Grado 1. Lordosis marginal. En este grado se observa una leve flexión de la columna vertebral de la rata, 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. La hembra muestra una dorsiflexión de la columna vertebral, seguida por la elevación de la cabeza en un ángulo próximo a 30° respecto al suelo, el cual es acompañado 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 dorsiflexión exagerada de la columna vertebral, seguida por la elevación de la cabeza a aproximadamente 45° o más respecto al piso.

6.4 Comprobación del área de implante

Al finalizar las pruebas, las hembras fueron sacrificadas mediante una sobredosis de Xilazina y ketamina, enseguida se inyectó un colorante (azul de metileno al 2%) a través de la cánula y se procedió a la extracción del cerebro en fresco. Posteriormente se le realizó un corte transversal a la altura del orificio dejado por la cánula. Esta práctica demostró si la cánula se encontraba localizada adecuadamente en el ventrículo cerebral derecho.

6.5 Fármacos

La OXT, el atosiban (antagonista de los receptores de oxitocina) y el antide (inhibidor de los receptores GnRH-1) fueron obtenidos de Sigma (St. Louis MO, EUA), la aspirina (inhibidor de la síntesis de prostaglandinas) se obtuvo de Tocris (the watkins building, atlantic rd, bristol bs11 9qd, reino unido) y el ONO-AE3-208 de Cayman Chemical (1180 E Ellsworth Rd, Ann Arbor, MI 48108, Estados Unidos)

El BE fue disuelto en aceite de cártamo a una concentración de 50 µg/ml. aspirina (30 µg) y ONO-AE3-208 (1 µg) en dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%, mientras que OXT (2 µg), atosiban (1.5 µg) y antide (1 µg) fueron disueltos 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 OXT 2 μ g/1 μ l estuvo basada en trabajos de Caldwell, JD., Prange, AJ y Pedersen, CA. (1986), la dosis de ATOSIBAN 1.5 μ g/1 μ l basada en trabajos de nuestro laboratorio Gómora-Arrati, P., González-Flores, O., Galicia-Aguas, YL., Hoffman, KL y Komisaruk, B. (2019). En cambio la dosis de ASPIRINA 30 μ g/1 μ l basada en trabajos de Takizawa, T., Ikeda, Y., Kawahata, M., Togashi, H., Yamamoto, M., Arishima, K. y Masaoka T. (1998), la dosis de ONO-AE3-208 1 μ g /1 μ l estuvo basada en los trabajos de Xu, S., Zhang, Z., Ogawa, O., Yoshikawa T. (2014), finalmente la dosis ANTIDE 1 μ g/1 μ l en trabajos de nuestro grupo de investigadores Blaustein, JD., Etgen, AM., González-Flores, O. (2018).

6.6 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante el programa SigmaPlot versión 11.0. Primero 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.

7. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Experimento 1. Efecto del atosiban, inhibidor selectivo de los receptores de oxitocina, sobre la expresión de la conducta de lordosis inducida por 2 µg de oxitocina icv, en ratas ovariectomizadas-pretratadas con estradiol.

Una semana después del implante intracerebroventricular, cada animal (n= 10) recibió una inyección subcutánea de 5 µg de BE, seguida a las treinta y nueve horas y media (39.5 horas) por la administración icv de 500 ng, 1 µg o 1.5 µg de atosiban y media hora después (40 horas) una dosis icv de 2 µg de oxitocina. Posteriormente, se realizaron las pruebas de CL en base a los tiempos establecidos previamente.

Experimento 2. Efecto de la administración icv del Ácido Acetilsalicílico (Aspirina) inhibidor de las isoformas COX-1 y COX-2 para la síntesis de la PGE2 o de ONO-AE3-208 antagonista de los receptores EP4 de Prostaglandina E2 (PGE2), sobre la expresión de la conducta de lordosis inducida por la administración icv de OXT, en ratas ovariectomizadas-pretratadas con estradiol.

Una semana después del implante intracerebroventricular, cada animal (n=10), recibió una inyección subcutánea de 5 µg de BE, seguida a las 39.5 horas por la administración icv de aspirina o de ONO-AE3-208 y una hora después (40 horas) una dosis icv de 2 µg de OXT. Posteriormente, se realizaron las pruebas de CL en base a los tiempos establecidos previamente.

Experimento 3. Efecto de la administración icv de antide antagonista de los receptores GnRH-1 de GnRH, sobre la expresión de la conducta de lordosis inducida por la administración icv de OXT, en ratas ovariectomizadas-pretratadas con estradiol.

Una semana después del implante intracerebroventricular, cada animal (n=10), recibió una inyección subcutánea de 5 µg de BE, seguida a las 39.5 horas por la administración icv de antide y 30 minutos después (40 horas) una dosis icv de 2 µg de OXT. Posteriormente, se realizaron las pruebas de CL en base a los tiempos establecidos previamente.

8. RESULTADOS

La figura 13 muestra el efecto de la inyección icv de 2 µg de OXT o su vehículo (control), comparado con el efecto inhibitor de su antagonista atosiban sobre el LQ (A) y LS (B) obtenidos a los 30, 120 y 240 minutos después de su administración en el modelo de la rata ovx pretratada con benzoato de estradiol. La prueba de Kruskal-Wallis mostró que tanto LQ como LS eran significativamente diferentes solo a los 120 minutos (para LQ $p < 0,001$ y LS $p < 0,004$). La prueba Post-hoc U de Mann-Whitney mostró que OXT elevó el LQ significativamente solo a los 120 y 240 min ($p < 0.01$) después de la infusión, mientras que para el LS solo hubo una diferencia significativa a los 120 min ($p < 0.01$). Mientras que la administración del antagonista de OXT, atosiban revirtió el aumento de LQ inducido por OXT a los 120 minutos ($p < 0,001$) y el LS a 120 minutos ($p < 0,01$). Los resultados mostraron que los efectos más grandes ocurrieron a los 120 y 240 minutos para los grupos de comparación de solución salina + solución salina frente a solución salina frente a OXT y a los 120 minutos para solución salina + OXT frente a ATO + OXT, de acuerdo con los análisis estadísticos.

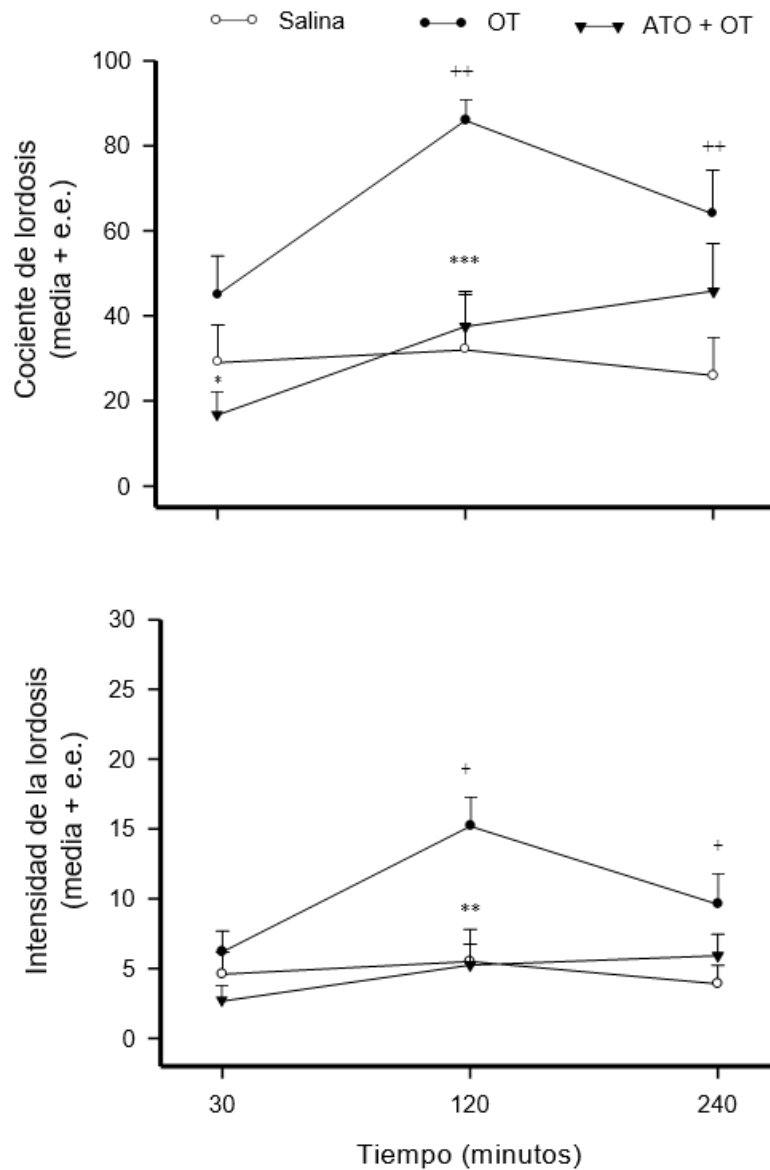


Figura 13. La oxitocina (OXT, 2 μ g; n = 10) indujo el comportamiento de la lordosis, en ratas ovx pretratadas con BE, LQ (A) a los 120 y 240 min y LS (B) a los 30 y 120 min después de la inyección icv, en comparación con el grupo que recibió su vehículo, solución salina + solución salina (1 μ l; n = 10). Este comportamiento, LQ (A) y LS (B), fue disminuido por la administración ICV del ATO (1,5 μ g; n = 12). Solución salina + solución salina en comparación con solución salina + OXT p <0,05; pb <0,01; cp <0,001. Solución salina + OXT comparada con ATO + OXT p <0,05; pb <0,01; cp <0,001.

La figura 14 muestra las diferencias significativas entre los tratamientos con DMSO + solución salina, DMSO + OT, DMSO + aspirina, así como los tratamientos con DMSO + ONO mediante la prueba de Kruskal-Wallis para LQ a 120 ($p < 0,001$) y 240 min ($p < 0,0003$); Se obtuvieron resultados similares para LS a 120 ($p < 0,002$) y 240 min ($p < 0,0007$). Estos resultados fueron confirmados por la prueba U de Mann-Whitney, que mostró que el comportamiento de la lordosis LQ (A) y LS (B) inducida por 2 μg de OXT ($n = 7$) fue significativamente diferente en los tres tiempos probados, 30 min ($p < 0,01$), 120 y 240 min ($p < 0,001$) que el de las hembras que recibieron DMSO + solución salina ($n = 10$). Sin embargo, la administración icv de aspirina administrada 30 min antes de la infusión de OXT redujo el efecto estimulante de OXT a los 120 y 240 min para LQ ($p < 0,01$).

La figura 14 también muestra el efecto de la inyección icv de 2 μg de OXT comparado con el efecto inhibitor del ONO-AE-208, antagonista específico de los receptores EP4 de PGE2 sobre el LQ a los 30, 120 y 240 minutos después de su administración. Cuando los datos de la comparación entre DMSO + solución salina, DMSO + OT y DMSO + ONO para LQ se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en 30 ($p < 0,011$), 120 ($p < 0,0008$) y 240 min ($p < 0,001$). Además, para las comparaciones de LS se revelaron diferencias estadísticas en 120 ($p < 0,0007$) y 240 min ($p < 0,001$). Como se muestra en la Fig. 3, ONO administrado 30 min antes de la OXT también disminuyó tanto el LQ como el LS a los 120 y 240 min ($p < 0,01$ para ambos). Finalmente, el análisis del efecto mostró diferencias importantes entre todos los grupos y tratamientos.

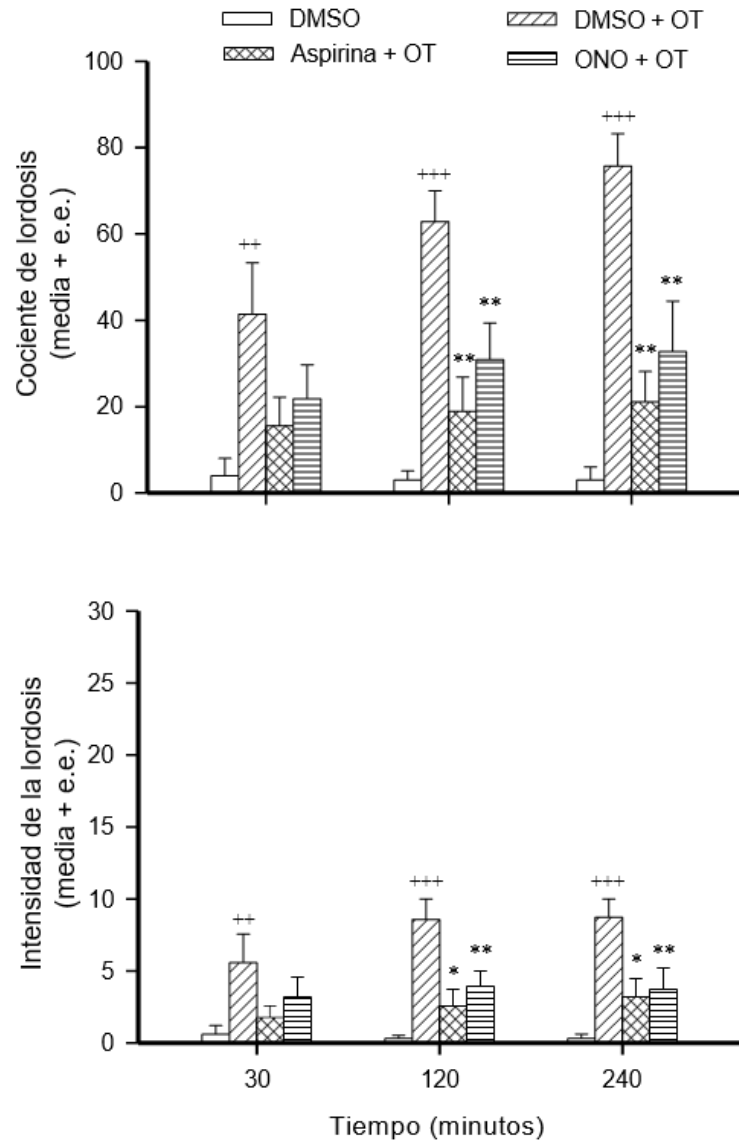


Figura 14. El comportamiento de la lordosis, LQ (A) o LS (B) fue facilitado por la inyección ICV de OXT (2 µg; n = 7) en ratas ovariectomizadas preparadas con BE en los tres tiempos observadas en comparación con DMSO + solución salina (1 µl; n = 10) grupo control. Este efecto conductual, LQ (A) o LS (B), disminuyó estadísticamente con la infusión icv de aspirina (30 µg; n = 9) a los 120 y 240 min. DMSO + solución salina frente a DMSO + OT $p < 0,05$; $p_b < 0,01$; $p_c < 0,001$. DMSO + OT frente a aspirina + OT $p < 0,05$; $p_b < 0,01$; $p_c < 0,001$. De igual forma el efecto conductual, LQ (A) o LS (B), se redujo estadísticamente mediante la infusión ICV de ONO-AE3-208 (ONO, 1 µg; n = 9) a los 120 y 240 min. DMSO + solución salina frente a DMSO + OT $p < 0,05$; $p_b < 0,01$; $p_c < 0,001$. DMSO + OT frente a ONO + OT $p < 0,05$; $p_b < 0,01$; $p_c < 0,001$.

La figura 15 muestra el efecto de la inyección icv de 2 μg de OXT comparado con el efecto inhibidor del Antide como antagonista del receptor GnRH-1 sobre el LQ a los 30, 120 y 240 minutos después de su administración. La prueba de Kruskal Wallis reveló diferencias estadísticas en los tres tiempos evaluados tanto para LQ [30 ($p < 0,007$), 120 ($p < 0,0005$) y 240 ($p < 0,001$)] como para LS [30 ($p < 0,008$), 120 ($p < 0,0009$) y 240 ($p < 0,003$)]. Las pruebas U de Mann-Whitney mostraron diferencias significativas en las tres evaluaciones ($p < 0,001$). Como se muestra, la administración de 1 μg de antide ($n = 8$) bloqueó LQ y LS provocados por OXT en ratas ovx, preparadas con EB en tres momentos analizados ($p < 0,001$ para cada uno).

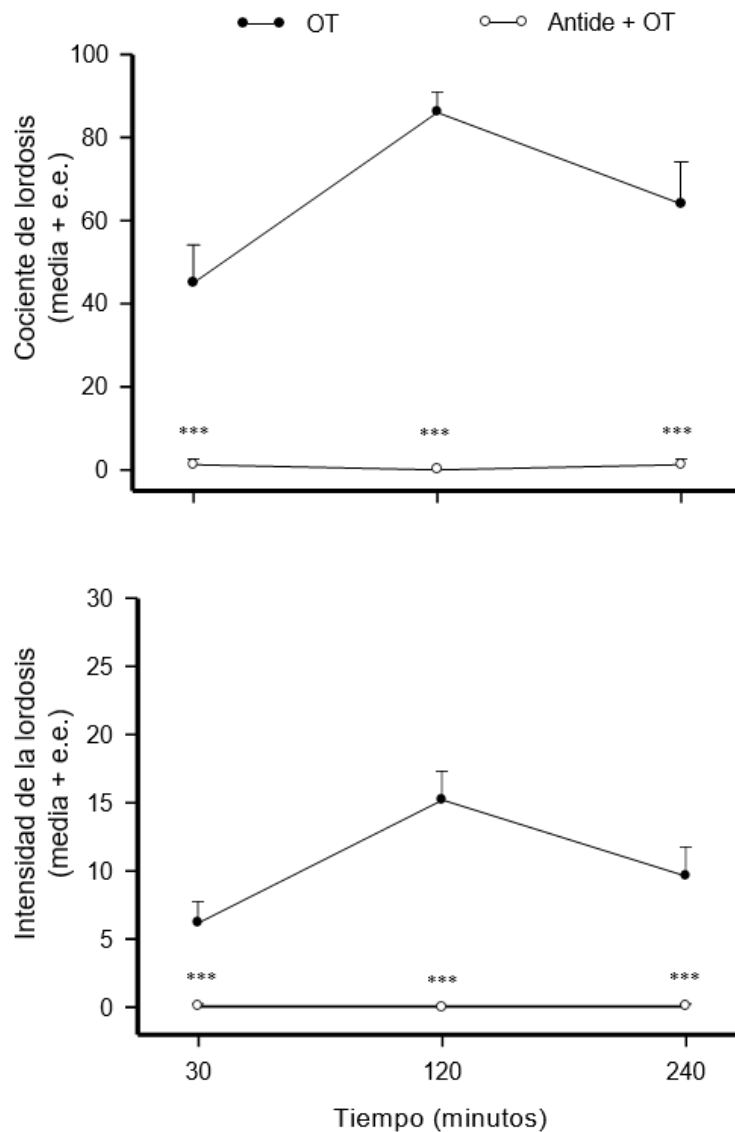


Figura 15. *Antide (1 µg; n = 8) administrado icv, bloqueó significativamente el comportamiento de la lordosis facilitado por la inyección intracerebral de OXT (2 µg; n = 10) en ratas ovariectomizadas preparadas con BE en las tres veces analizadas. Solución salina + solución salina frente a solución salina + OT p <0,05; pb <0,01; cp <0,001. Solución salina + OT frente a Antide + OT p <0,05; pb <0,01; cp <0,001.*

9. DISCUSION

los mecanismos celulares por los que OXT ejerce la lordosis no están claros; sin embargo, no se descarta que este pueda ser el mismo mecanismo por el que se induce la ovulación ya que ahora se sabe que los axones de las neuronas liberadoras de OXT se proyectan desde los núcleos supraóptico y paraventricular hasta la eminencia media y el hipotálamo, área involucrada en la expresión de la conducta de lordosis (Armstrong,2015; Blaustein and Mani, 2012).). Además, la concentración de ARNm de OXT aumenta en el núcleo paraventricular durante el tratamiento de BE+P (Amico et al., 1997). Este aumento es de mayor magnitud durante la actividad sexual (Nyuyki y cols., 2011). Actualmente se conoce que la administración de estradiol al unirse a su isoforma ER α induce la síntesis de receptores de P y OXT.

Los resultados presentados apoyan y amplían los resultados anteriores que muestran que la administración intracerebral de OXT facilita una conducta clara de lordosis en ratas preparadas con BE (Arletti y Bertolini,1985; Caldwell y cols.,1986; Caldwell y cols., 1989; Gorzalka y Lester, 1987; Schulze y Gorzalka, 1991; Schumacher y cols., 1989).

Si bien el estudio de la lordosis inducida por PGE2 y GnRH ha sido ampliamente documentado (Beyer et al., 1997; Buntin and Lisk, 1979; Lima-Hernández et al., 2014; Ramírez-Orduña et al., 2007), los resultados de este estudio muestran que la administración icv de atosiban (antagonista del receptor OXT), aspirina (un inhibidor de COX), ONO (antagonista del receptor EP4 de PGE2) y antide (antagonista del receptor de GnRH), disminuyen significativamente la lordosis inducida por OXT en ratas preparadas con BE. Estos datos apoyan la hipótesis de que la vía OXT / PGE2 / GnRH está involucrada en la lordosis inducida por OXT. Así, en nuestros experimentos más recientes, hemos propuesto que

la conducta de lordosis inducida por una variedad de compuestos es a través de la liberación de GnRH (Domínguez-Ordóñez y cols., 2018; García-Juárez y cols., 2011; Lima-Hernández y cols., 2012). Así, se ha propuesto que OXT promueve la liberación pulsátil de GnRH indirectamente a través de PGE2 (Clasadonte y cols., 2011; Ojeda y cols., 1977a, 1977b, 1979). Por ejemplo, estudios in vivo en ratas tratadas con hormonas esteroides (Ojeda y cols., 1977a, 1977b, 1979), y estudios in vitro (Clasadonte et al., 2011) realizados con fragmentos hipotalámicos y de APO mostraron que PGE2 estimulaba tanto la secreción de LH como de GnRH (Bigdeli y Snyder, 1978; Ojeda y cols., 1975; Ojeda y Negro-Vilar., 1985; Ojeda y cols., 1977b), respectivamente. Además, la inhibición de la síntesis de PGE2 suprime la secreción de GnRH, inducida por noradrenalina (Ojeda y cols., 1979, 1982; Heaulme y Dray, 1984). Por lo tanto, la liberación de GnRH inducida por la OXT requiere en primera instancia la activación de los OTR, la síntesis de PGE2 (proceso que se ha demostrado que ocurre en astrocitos adyacentes a neuronas hipotalámicas) (Clasadonte y cols., 2011). Posteriormente, una vez liberada la PGE2, ésta actúa sobre sus receptores ubicados en las neuronas liberadoras de GnRH provocando la síntesis y liberación de GnRH que al actuar sobre sus receptores GnRH-1 desencadena una serie de eventos intracelulares que culminan en la activación del RP de manera ligando independiente, lo cual permite la expresión de la CL.

Este mecanismo de facilitación de la CL por OXT a través de la activación indirecta de los RP por GnRH ha sido planteado debido a las siguientes evidencias; 1) la administración icv del atosiban redujo la lordosis al inhibir el efecto de la OXT sobre su receptor, 2) Además, se conoce que la administración ICV o intratecal de 500 µg de atosiban reduce el efecto nociceptivo producido en la rata hembra cuando recibió estimulación vaginal del pene macho (Gomora-Arrati et al., 2019). Incluso en diversos experimentos realizados en ratas hembra intactas la administración intracerebral de antagonistas de OXT en APOm y ATV bloquearon el comportamiento de lordosis inducido por la suplementación combinada de estrógeno y progesterona (Benelli y cols., 1994; Caldwell y cols., 1994); Frey y Walf, 2010; Pedersen y Boccia, 2002;).

Otra evidencia que apoya nuestra propuesta se debe a que la administración icv de aspirina (inhibidor de ambas isoformas de la COX; enzimas encargadas de la síntesis de PGE2) redujo los efectos de la OT sobre el comportamiento de la lordosis en ratas preparadas con BE. El mecanismo celular por el cual la aspirina ejerce su efecto es mediante la inhibición de la biosíntesis de prostanoideos cíclicos que son generados por el metabolismo del ácido araquidónico mediante la actividad de la ciclooxigenasa (Awtry and Loscalzo, 2000). Por lo tanto, es posible que la inhibición de la lordosis inducida por la OT pueda deberse al bloqueo de la síntesis de PGE2. En apoyo de esta idea, se ha demostrado que la indometacina, otro inhibidor de la COX, reducía el comportamiento de la lordosis inducida por una variedad de progestinas reducidas del anillo A (Beyer et al., 1999). En línea con esta serie de evidencias y para integrar la participación de los receptores de PGE2, se sabe que este prostanoide al unirse a sus receptores EP4 induce el incremento de los niveles de AMPc (Coleman y cols., 1994), mediando a nivel fisiológico la angiogénesis (Zhang & Daaka, 2011) y la relajación vascular (Hristovska y cols., 2007). A nivel conductual, se ha encontrado que la activación de los receptores EP4 participa en la supresión de la ingesta alimenticia en ratones (Ohinata y cols., 2006), y su inhibición mejora la función cognitiva en un modelo de Alzheimer (Hoshino y cols., 2012). Además, se ha demostrado que la activación de los EP4 por PGE2, a su vez, induce la activación de la PKC y la p38 MAPK (Fiebich et al., 2001). Así, en una serie de estudios realizados en nuestro laboratorio demostramos que la conducta sexual femenina (lordosis y proceptividad) facilitada por la PGE2 en ratas preparadas con BE se redujo mediante la administración ICV de inhibidores de diferentes proteínas cinasas, como el RpAMPS (inhibidor de la PKA), KT5823 (inhibidor de PKG) y PD98059 (inhibidor de MAPK) (González-Flores et al., 2009; Ramírez-Orduña et al., 2007). Por lo tanto, con estos resultados y los obtenidos en el presente trabajo, ¿se podría concluir que el comportamiento de la lordosis inducida por la OXT se produce a través de diferentes vías intracelulares que podrían ser activadas por los EP4 ya que la administración ICV del ONO? redujo este comportamiento.

Una vez liberada la PGE2 y al unirse a sus receptores EP4 induce una serie de eventos intracelulares que provocan la liberación de GnRH una de las hormonas más importantes en la facilitación de la CL ya que debe coincidir con el momento de la ovulación para asegurar la

fecundación del óvulo por parte de los espermatozoides (Pfaus et al., 2015). Esta idea es apoyada por el hecho de que la administración intracerebral del antide bloquea la CL inducida por progestinas reducidas del anillo A, GnRH, PGE2, leptina, G1 (un agonista de GPER-1) o por la estimulación vaginocervical (García-Juárez et al., 2011; Domínguez-Ordóñez et al., 2018; Gómora-Arrati et al., 2008).

Finalmente, la Fig.4 propone un modelo de comunicación paracrina entre los astrocitos y las neuronas productoras de GnRH que regulan el comportamiento sexual en la rata hembra. Este modelo se basa sobre los hallazgos recientes de que ATO, aspirina, ONO y antide, inhibieron la lordosis inducida por OXT. Se sabe que los astrocitos contienen OXTR de membrana, que cuando se activan mediante OXT conducen a la activación de la enzima COX-2, que a su vez metaboliza el ácido araquidónico en PGE2. La PGE2 derivada de astrocitos activa los receptores EP4, que luego activan la vía cAMP / PKA en las neuronas GnRH. La liberación de PGE2 de los astrocitos activa los receptores EP4 ubicados en las neuronas GnRH que conducen a la liberación de GnRH que coincide al mismo tiempo el inicio de la conducta sexual femenina con la ovulación.

En conclusión, los presentes resultados amplían el conocimiento de que las acciones de diferentes hormonas en el cerebro se pueden generar tanto en neuronas como en células gliales, ya que los mismos receptores de los agentes que son capaces de inducir la conducta sexual femenina, como la melatonina, tiroides y las hormonas sexuales, OXT, leptina, factores de crecimiento, etc., también se encuentran en las células gliales (Cipolla-Neto and do Amaral, 2018; Fujita and Yamashita, 2019; Melcangi et al., 2001; Mohácsik et al., 2011; Tasker et al., 2012). García Segura propuso que la función de las células gliales podría estar regulada por hormonas que, al actuar directamente sobre la glía, generan señales que se envían a las neuronas para modular su función (García Segura y McCarthy, 2004; García Segura y Melcangi, 2006). El efecto sobre las neuronas puede producir la secreción de un factor de crecimiento, neurohormonas o una sustancia parecida a un transmisor.

10. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permiten concluir que la administración intracerebroventricular de 2μ de oxitocina inducen conducta de lordosis, en el modelo de la rata ovariectomizada pretratada con estradiol y la participación de los receptores de oxitocina se evaluó mediante la administración del inhibidor de los receptores de oxitocina pues redujo de manera importante la expresión de la conducta de lordosis, además la disminución en la respuesta de lordosis, por la administración del inhibidor de la síntesis de PGE2 muestra la participación de dicha hormona en la vía producida por la oxitocina para la activación de la conducta de lordosis.

De igual forma la administración del inhibidor de los receptores EP4 de PGE2 muestra que juegan un papel importante en el desencadenamiento de la expresión de la conducta de lordosis por oxitocina.

Finalmente, el efecto inhibitor del antagonista de los receptores de GnRH sobre la conducta de lordosis fue muy intenso, lo que sugiere que este receptor es un mediador muy importante para la expresión de la conducta de lordosis.

Nuestros resultados apoyan la idea de la participación de la vía OXT/PGE2/GnRH y la activación de sus receptores intracelulares en la activación de la conducta de lordosis.

Finalmente se puede demostrar la participación de los astrocitos hipotalámicos en esta vía desencadenada por la administración intracerebroventricular de OXT en el modelo de la rata ovx pretratada con benzoato de estradiol.

11. PERSPECTIVAS

El hecho de que OXT induce CL en el modelo de la rata OVX pretratada con BE, nos permite pensar en los probables mecanismos moleculares que esta hormona utiliza. Uno de estos mecanismos y quizá el más importante es la participación de los astrocitos para la síntesis y liberación de PGE2 a través de la activación de sus receptores a OXT, un segundo mecanismo sería la participación de los receptores GnRH-1 para la liberación de GnRH, puesto que existen evidencias suficientes en esta tesis, podemos evidenciar la participación de la vía OXT/PGE2/ GnRH en la inducción de la CL.

12. BIBLIOGRAFÍA

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.

Butcher RL, Fugo NW y Collins WE. 1972. "Semicircadian rhythm in plasma levels of prolactin during early gestation in the rat." ("Semicircadian rhythm in plasma levels of prolactin during early ...") *Endocrinology* 90: 1125-1127.

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.

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.

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.

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.

Beach FA. 1976. Sexual attractivity, proceptivity, and receptivity in female mammals. *Horm Behav* 7: 105-138.

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

Churchland, P. 2012 El cerebro moral. *Lo que la neurociencia nos cuenta sobre la moralidad*. Editorial Paidós Ibérica SA.

Micevych PE y Dewing P. 2011. Membrane-initiated estradiol signaling regulating sexual receptivity. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2: 26.

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, 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.

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.

Hardy DF y DeBold JF. 1972. Effects of coital stimulation upon behavior of the female rat. *J Comp Physiol Psychol*, 78, 400-408.

Beach FA. 1942. Importance of progesterone for induction of sexual receptivity in spayed female rats. *Proc Soc Exp Biol* 51: 369-371.

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

Beyer C. 1980. A model for explaining estrogen progesterone interactions in induction of lordosis behavior. En: *Endocrinology*. Cammusigs IA, Fander JW y Mendelshon FAD (eds.) Editorial. Camberra. Australia. pp. 101-104.

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.

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.

Yanase M y Gorski RA. 1976. Sites of estrogen and progesterone facilitation of lordosis behavior in the spayed rat. *Biol Reprod* 15: 536-543.

Powers JB. 1970. Hormonal control of sexual receptivity during the estrous cycle of the rat. *Physiol Behav* 5: 831-835.

Moreines JK y Powers JB. 1977. Effects of acute ovariectomy on the lordosis response of female rats. *Physiol Behav* 19: 277-283.

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.

Morali G y Beyer C. 1979. Neuroendocrine control of mammals estrous behavior. En: *Endocrine control of sexual behavior*. Beyer C (eds.) Editorial. Raven Press. New York. pp.

Whalen RE. 1974. Estrogen-progesterone induction of mating in female rats. *Horm Behav* 5: 157-162.

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.

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

Pfaff DW y Sakuma Y. 1980. *Estrogens and Brain Function*. Editorial. Springer-Verlag. New York.

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.

Parsons B, MacLusky NJ, Krey L, Pfaff DW y McEwen BS. 1980. The temporal relationship between estrogen-inducible progestin receptors in the female rat brain and the time course of estrogen activation of mating behavior. *Endocrinology* 107: 774-779.

Glaser JH y Barfield RJ. 1984. "Blockade of progesterone-activated estrous behavior in rats by intracerebral anisomycin is site specific." ("Blockade of progesterone-activated estrous behavior in rats by ...") *Neuroendocrinology* 38: 337-343.

Kubli-Garfias C y Whalen RE. 1977. Induction of lordosis behavior in female rats by intravenous administration of progestins. *Horm Behav* 9: 380-6.

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.

Beyer C, González-Mariscal G, Eguívar JR y Gómora P. 1988. Lordosis facilitation in estrogen primed rats by intrabrain injection of pregnanes. *Pharmacol Biochem Behav.* 31: 919-926.

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.

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.

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.

Kow LM y Pfaff DW. 1979. Responses of single units in sixth lumbar dorsal root ganglion of female rats to mechano stimulation relevant for lordosis reflex. *J Neurophysiol* 42: 203-213.

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.

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.

Ghanima A, Bennis M, Rampin O y Rousseau JP. 2000. Influence of estrous cycle on vagino-cervical sensitivity: a fos-immunohistochemical study of lumbosacral spinal cord. *Brain Res* 880: 109-117.

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 vagino-cervical stimulation: modulation by steroid hormones. *Brain Res* 741: 314-330.

Komisaruk BR, Adler NT y Hutchison J. 1972. Genital sensory field: enlargement by estrogen treatment in female rats. *Science* 178: 1295-1298.

Kow LM, Montgomery MO y Pfaff DW. 1977. Effects of spinal cord transections on lordosis reflex in female rats. *Brain Res* 123: 75-88.

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.

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.

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.

Coria-Ávila GA y Pfaus JG. 2007. Neuronal activation by stimuli that predict sexual reward in female rats. *Neuroscience* 148: 623-632.

Paredes-Ramos P, Pfaus JG, Miquel M, Manzo J y Coria-Ávila GA. 2011. Sexual reward induces Fos in the cerebellum of female rats. *Physiol Behav* 102: 143-148.

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.

Flanagan-Cato LM, Lee BJ y Calizo LH. 2006. Co-localization of midbrain projections, progesterin receptors, and mating-induced fos in the hypothalamic ventromedial nucleus of the female rat. *Horm Behav* 50: 52-60.

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.

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-alpha, retrograde tract tracing from the periaqueductal gray, and mating-induced Fos expression. *Endocrinology* 144: 5430-5440.

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.

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.

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.

Gerrits PO, Krukerink M y Veening JG. 2009. Columnar organization of estrogen receptor-alpha immunoreactive neurons in the periaqueductal gray projecting to the nucleus para-

retroambiguus in the caudal brainstem of the female golden hamster. *Neuroscience* 161: 459-474.

Corodimas KP y Morrell JJ. 1990. Estradiol-concentrating forebrain and midbrain neurons project directly to the medulla. *J Comp Neurol* 291: 609-620.

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.

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.

Singer JJ. 1968. Hypothalamic control of male and female sexual behavior in female rats. *J Comp Physiol Psychol* 66: 738-742.

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.

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.

Parada M, Chamas L, Censi S, Coria-Ávila G y Pfaus JG. 2010. Clitoral stimulation induces conditioned place preference and Fos activation in the rat. *Horm Behav* 57: 112-118.

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.

Veening JG y Coolen LM. 1998. Neural activation following sexual behavior in the male and female rat brain. *Behav Brain Res* 92: 181-193.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

Rodgers CH y Law OT. 1967. The effects of habenular and medial forebrain bundle lesions on sexual behavior. *Psychon Sci* 8: 1-2.

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.

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.

Powers B y Valenstein ES. 1972. Sexual receptivity: facilitation by medial preoptic lesions in female rats. *Science* 175: 1003-1005.

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.

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.

.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.

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.

Nance DM, Shryne J y Gorski RA. 1974. Septal lesions: effects on lordosis behavior and pattern of gonadotropin release. *Horm Behav* 5: 73-81.

Nance DM, Shryne J y Gorski RA. 1975. Effects of septal lesions on behavioral sensitivity of female rats to gonadal hormones. *Horm Behav* 6: 59-64.

Moss RL. 1971. Modification of copulatory behavior in the female rat following olfactory bulb removal. *J Comp Physiol Psychol* 74: 374-38

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.

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.

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.

. 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.

. Mani SK y Portillo W. 2010. Activation of progestin receptors in female reproductive behavior: Interactions with neurotransmitters. *Front Neuroendocrinol* 31: 157-171.

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.

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.

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.

McDonnell DP. 1995. Unraveling the human progesterone receptor signal transduction pathway Insights into antiprogestin action. *Trends Endocrinol Metab* 6: 133-138.

. 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.

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.

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.

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.

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. PKCalpha and PKCdelta activation regulates transcriptional activity and degradation of progesterone receptor in human astrocytoma cells. *Endocrinology* 156: 1010-1022.

Bai W y Weigel NL. 1995. Phosphorylation and steroid hormone action. *Vitam Horm* 51: 289-313.

Wei LL, González-Aller C, Wood WM, Miller LA y Horwitz KB. 1990. 5'-Heterogeneity in human progesterone receptor transcripts predicts a new amino-terminal truncated "C"-receptor and unique A-receptor messages. *Mol Endocrinol* 4: 1833-1840.

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.

Mulac-Jericevic B y Conneely OM. 2004. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction* 128: 139-146.

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.

Wei LL, Hawkins P, Baker C, Norris B, Sheridan PL y Quinn PG. 1996. An amino-terminal truncated progesterone receptor isoform, PRc, enhances progestin-induced transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 10: 1379-1387.

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.

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.

. 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.

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. 2008. Integration of progesterone receptor action with rapid signaling events in breast cancer models. *J Steroid Biochem Mol Biol* 108: 203-12.

Beato M y Sanchez-Pacheco A. 1996. Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocr Rev* 17: 587-609.

. 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.

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.

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.

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.

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.

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.

Labriola L, Salatino M, Proietti CJ, Pecci A, Coso OA, Kornblihtt AR, Charreau EH y Elizalde PV. 2003. Heregulin induces transcriptional activation of the progesterone receptor by a mechanism that requires functional ErbB-2 and mitogen-activated protein kinase activation in breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 23: 1095-1111.

Lange CA, 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.

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.

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.

Moguilewsky M y Raynaud JP. 1979. The relevance of hypothalamic and hypophyseal progestin receptor regulation in the induction and inhibition of sexual behavior in the female rat. *Endocrinology* 105: 516-22.

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

Parsons B, MacLusky NJ, Krey L, Pfaff DW y McEwen BS. 1980. The temporal relationship between estrogen-inducible progestin receptors in the female rat brain and the time course of estrogen activation of mating behavior. *Endocrinology* 107: 774-779.

Ahdieh HB, Brown TJ, Wade GN y Blaustein JD. 1986. Hypothalamic nuclear progestin receptors and the duration of sexual receptivity in ovariectomized and ovariectomized-hysterectomized rats. *Physiol Behav* 36: 211-215.

Moguilewsky M y Raynaud JP. 1979. The relevance of hypothalamic and hypophyseal progestin receptor regulation in the induction and inhibition of sexual behavior in the female rat. *Endocrinology* 105: 516-22.

Pollio G, Xue P, Zanisi M, Nicolini A y Maggi A. 1993. Antisense oligonucleotide blocks progesterone-induced lordosis behavior in ovariectomized rats. *Brain Res Mol Brain Res* 19: 135-139.

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.

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.

Du Vigneaud V, Ressler C, Trippett S. J. 1953. The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. *Biol Chem. Dec*; 205 (2): 949-57.

Schumacher M, Coirini H, Frankfurt M y McEwen BS. 1989. Localized actions of progesterone in hypothalamus involve oxytocin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86, 6798-6801.

Flores-Acevedo, S. y Cárdenas, F.P. (2016). Rol modulador de la oxitocina en la interacción social y el estrés social.

Ross, H. E. & Young, L. J. (2009). Oxytocin and the neural mechanisms regulating social cognition and affiliative behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 30 (4), 534-547.

Gimpl G, Fahrenholz F. 2001. The oxytocin receptor system: structure, function and regulation. *Physiol Rev.* Apr; 81(2):629-83.

Lee, H. J., Macbeth, A. H., Pagani, J. H., & Scott, Y. I. (2009). Oxytocin: The great facilitator of life. *Progress in Neurobiology*, 88 (2), 127-151.

155. Yamanaka C, Lebrethon MC, Vandersmissen E, et al. 1999. Early prepubertal ontogeny of pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion: I. Inhibitory autofeedback control through prolyl endopeptidase degradation of GnRH. *Endocrinology*;140(10):4609-4615.

. Bourguignon JP, Ge´rard A, Alvarez Gonzalez ML, Franchimont P 1992 Neuroendocrine mechanism of onset of puberty. Sequential reduction in activity of inhibitory and facilitatory N-methyl-d-aspartate receptors. *J Clin Invest* 90:1736–1744.

Arletti, R. & Bertolini, A. (1985). Oxytocin stimulates lordosis behavior in female rats. *Neuropeptides*, 6 (3), 247-253.

Pfaus JG. 2009. Pathways of sexual desire. *J Sex Med.*; 6(6):1506-1533.

Veening JG, de Jong TR, Waldinger MD, Korte SM, Olivier B. 2015. The role of oxytocin in male and female reproductive behavior. *Eur J Pharmacol.* 2015;753:209-228.

Caldeyro-Barcia R, Poseiro JJ. 1959. Oxytocin and contractility of the pregnant human uterus. *Ann N Y Acad Sci* 1959, 75:813-30.

Olazábal DE, Pereira M, Agrati D, Ferreira A, Fleming AS, González-Mariscal G, Lévy F, Lucion AB, Morrell JJ, Numan M, Uriarte N. 2013. Flexibility and adaptation of the neural substrate that supports maternal behavior in mammals. *Neurosci Bio behav Rev*; 37(8):1875-92.

Lim MM, Young LJ. 2006. Neuropeptidergic regulation of affiliative behavior and social bonding in animals. *Horm Behav* 2006, 50:506-17.

Uvnäs-Moberg, K.1998. Oxytocin may mediate the benefits of positive social interaction and emotions. *Psychoneuroendocrinology* 1998, 23, 8, 819-35.

Bridges RS. 1996. Biochemical basis of parental behavior in the rat. *Advance in the Study of Behavior*. In *Parental Care: Evolution, Mechanisms, and Adaptive Significance*, Ed. By Rosenblatt JS, and Snowdon CT, Academic Press vol. 25, 215-242.

Numan M, Rosenblatt JS, Komisaruk BR. 1977. Medial preoptic area and onset of maternal behavior in the rat. *J Comp Physiol*, 91(j):146-6.

Numan M, Morrell JI, Pfaff DW. 1985. Anatomical identification of neurons in selected brain regions associated with maternal behavior deficits induced by knife cuts of the lateral hypothalamus in rats. *J Comp Neurol*, 237 (4):552-64.

Manning, M., Misicka, A., Olma, A., Bankowski, K., Stoev, S., Chini, B. et al. 2012. Oxytocin and vasopressin agonists and antagonists as research tools and potential therapeutics. *J.Neuroendocrinol.*, 24 (4), 609-628.10.1111

Panatier A.2009. Glial cells: indispensable partners of hypothalamic magnocellular neurones. *J Neuroendocrinol.*; 21(7):665-672.

. Anne-Simone Parent, Grégory Rasier, Valérie Matagne, Alejandro Lomniczi, Marie-Christine Lebrethon, Arlette Gérard, Sergio R. Ojeda, and Jean-Pierre Bourguignon 2008. Oxytocin Facilitates Female Sexual Maturation through a Glia-to-Neuron Signaling Pathway.

Sharif A, Baroncini M, Prevot V. 2013. Papel de la glía en la regulación de la actividad y secreción neuronal de la hormona liberadora de gonadotropina. *Neuroendocrinología.*; 98 (1): 1-15.

Pedersen CA, Boccia ML. 2002 Oxytocin maintains as well as initiates female sexual behavior: effects of a highly selective oxytocin antagonist. *Horm Behav.*;41(2):170-177.

Shubert, P. J. (1995). Atosiban. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 38(4), 722–724. doi:10.1097/00003081-199538040-00007

. S. Phaneuf, G. Asbóth, I.Z. MacKenzie, P. Melin, A. López Bernal, Effect of oxytocin antagonists on the activation of human myometrium in vitro: Atosiban prevents oxytocin-induced desensitization, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Volume 171, Issue 6, 1994, Pages 1627-1634, ISSN 0002-9378.

Wellnitz, O., Bruckmaier, R., Albrecht, C., & Blum, J. (1999). Atosiban, an oxytocin receptor blocking agent: Pharmacokinetics and inhibition of milk ejection in dairy cows. *Journal of Dairy Research*, 66(1), 1-8. doi:10.1017/S0022029998003227).

Rodríguez-sierra J., Komisaruk B. 1977. Effects of Prostaglandin E, and Indomethacin on Sexual Behavior in the Female Rat. *Hormones and Behavior* 9, 281-289

Deininger MH, Schluesener HJ .1999. Cyclooxygenases-1 and -2 are differentially localized to microglia and endothelium in rat EAE and glioma. *J Neuro immunol* 95(1-2):202-208

Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, Barnes CA, Worley PF .1993. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 11(2):371-386

Smith W.L., DeWitt D.L., Garavito R.M. 2000. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*; 69: 145-182.

Baba H, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ. 2001. Direct activation of rat spinal dorsal horn neurons by prostaglandin E2. *J Neurosci*. 46721:1750-1756.

Sugimoto Y, Narumiya S.2007. Prostaglandin E receptors. *J Biol. Chem* 282:11613-11617.

Clasadonte J, Poulain P, Hanchate NK, Corfas G, Ojeda SR, Prevot V.2011. Prostaglandin E2 release from astrocytes triggers gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron firing via EP2 receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:16104–16109.

Hyun Jin Lee ; Silvana M., Cantú; Horacio A. Peredo1; Ana M. Puyo; Adriana Donoso.2017. Prostanoides: Un viaje a lo largo de su evolución histórica y aplicaciones clínicas.

Schrör, K. (2009). Geschichte von Acetylsalicylsäure. 100 Jahre erfolgreiche Arzneimittelforschung. *Pharmazie in Unserer Zeit*, 38(4), 306–313. doi:10.1002/pauz.200900319

Borriello, M., & Stasi, L. P. (2013). Prostaglandin EP4 antagonists. *Pharmaceutical Patent Analyst*, 2(3), 387–397. doi:10.4155/ppa.13.15

Regan JW. 2003. EP2 and EP4 prostanoid receptor signaling. *Life Sci.* ;74 (2-3):143-53. doi: 10.1016/j.lfs.2003.09.031. PMID: 14607241.

Savarese TM and Fraser CM (1992) In vitro mutagenesis and the search for structure-function relationships among G protein-coupled receptors. *Biochem J* 283:1–19.

Narumiya S, Sugimoto Y, and Ushikubi F (1999) Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 79:1193–1226.

. Coleman, R.A., Smith, W.L., Narumiya, S., 1994b. VIII. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol. Rev.* 46, 205–229.

Nishigaki, N., Negishi, M., Ichikawa, A., 1996. Two Gs-coupled prostaglandin E receptor subtypes, EP2 and EP4, differ in desensitization and sensitivity to the metabolic inactivation of the agonist. *Mol. Pharmacol.* 50, 1031–1037.

Xu S, Zhang Z, Ogawa O, Yoshikawa T, Sakamoto H, Shibasaki N, Goto T, Wang L, Terada N. 2014. An EP4 antagonist ONO-AE3-208 suppresses cell invasion, migration, and metastasis of prostate cancer. *Cell Biochem Biophys.* ;70(1):521-7. doi: 10.1007/s12013-014-9951-2. PMID: 24744183.

Flanagan, Colleen A., Robert P. Millar, and Nicola Illing. "Advances in understanding gonadotrophin-releasing hormone receptor structure and ligand interactions." *Reviews of reproduction* 2 (1997): 113-120.

Schiavi R, Jutisz M, Sakiz E, Guillemin R. 1963. Stimulation of ovulation by purified lhrh-releasing factor (lrf) in animals rendered anovulatory by hypothalamic lesion. *Proc soc exp. med.* 114:426-429.

Igarashi M, Nallar R, McCann Sm. 1964. Further studies on the follicle-stimulating hormone-releasing action of hypothalamic extracts. *Endocrinology.* 75:901-907.

Knobil E. 1980. The neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res.* 36:53-88.

Roa J, Tena-Sempere M. 2007. KiSS-1 system and reproduction: comparative aspects and roles in the control of female gonadotropic axis in mammals. *Gen Comp Endocrinol.* 153:132-40.

Brownstein MJ, Russell JT, Gainer H. 1980. Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones. *Science* 207:373-378.

Sealfon, S.C., Weinstein, H., Millar, R.P., 1997. Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocr. Rev.* 18, 180–205.

Millar, R.P., hu, Z-L., Pawson, A.J., Flanagan, C.A., Morgan, K., Maudsley, S.R., 2004. Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrine Reviews* 25, 235–275.

Kenakin, T., 1993. *Pharmacologic Analysis of Drug–Receptor Interaction*, 2nd ed. Raven Press, New York.

Domínguez-Ordóñez R, García-Juárez M, Lima-Hernández FJ, Gómora-Arrati P, Domínguez-Salazar E, Blaustein JD, Etgen AM, González-Flores O. Lordosis facilitated by GPER-1 receptor activation involves GnRH-1, progesterin and estrogen receptors in estrogen-primed rats. *Horm Behav.* 2018 Feb; 98:77-87. doi: 10.1016/j.yhbeh.2017.12.005. Epub 2018 Jan 3. PMID: 29269179.

Siegel. Y Castellan.N. J (1995). *Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta*. México: Trillas. ISBN 10: 9682451019.

Hans H. Zingg, Stephane A. Laporte (2003). The oxytocin receptor, *Trends in Endocrinology & Metabolism*, Volume 14, Issue 5, 2003, Pages 222-227, ISSN 1043-2760, [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(03\)00080-8](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(03)00080-8).

National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 5311010, Atosiban. Retrieved June 2, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Atosiban>

Centro Nacional de Información Biotecnológica (2022). Resumen de compuestos de PubChem para CID 10111831, Ono-AE3-208. Recuperado el 2 de junio de 2022 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ono-AE3-208>

13. GLOSARIO DE TÉRMINOS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
APOm	Área preóptica media
ATO	Atosiban
ATV	Área tegmental ventral
BE	Benzoato de 17- β estradiol
CL	Conducta de lordosis
COOH	Grupo carboxilo
COX	Enzima ciclooxigenasa
COX1	Enzima ciclooxigenasa 1
COX2	Enzima ciclooxigenasa 2
DMSO	Dimetil sulfoxido
EP	Receptor de Prostaglandina
EP1	Receptor de Prostaglandina 1
EP2	Receptor de Prostaglandina 2
EP3	Receptor de Prostaglandina 3
EP4	Receptor de Prostaglandina 4
FA-1	Factor de activación 1
FA-2	Factor de activación 2
FA-3	Factor de activación 3
FRM	Formación reticular mesencefálica
FSH	Hormona folículo estimulante
GABA	Acido gamma-amino butírico
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
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
NPV	Núcleo paraventricular
NSO	Núcleo supra óptico
ONO	Inhibidor del receptor EP4
OVX	Ovariectomía
OXT	Oxitocina
OXTR	Receptor de oxitocina
PAG	Sustancia gris periacueductal
PD98059	Inhibidor de la MAPK
PGD2	Prostaglandina D2
PGE2	Prostaglandina E2
PGF2 α	Prostaglandina F2 α
PGG2	Prostaglandina G2
PGH2	Prostaglandina H2
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PKG	Proteína cinasa G
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
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
sc	Vía de administración subcutánea
µg	Microgramos

14. ANEXOS

Ponencias

La Conducta de Lordosis Inducida por Oxitocina Involucra la Síntesis de PGE₂ y la Subsecuente Liberación de GnRH en Ratas Pretratadas con Estradiol. Seminario del Posgrado en Ciencias Biológicas UAT. 22/4/2021



Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
División de Ciencias Biológicas
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado

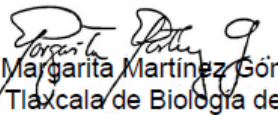


CONSTANCIA

A Sandra Tapia Hernández
Estudiante Maestría en Ciencias Biológicas

Por impartir el seminario
**"La conducta de lordosis inducida por oxitocina involucra la
síntesis de PGE2 y la subsecuente liberación de GnRH
en ratas pretratadas con estradiol"**

"Por la Cultura a la Justicia Social"
Tlaxcala, Tlax., a 22 de abril de 2021


Dra. Margarita Martínez Gómez
Coord. Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma: ISO 9001-2015- NMX-CC-9001-IMNC-2015



PCB/21-1/017-rsl

PUBLICACIONES

Oxytocin induces lordosis behavior in female rats through the prostaglandin E2/GnRH signaling system. Hormones and Behavior.



Contents lists available at ScienceDirect

Hormones and Behavior

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

Oxytocin induces lordosis behavior in female rats through the prostaglandin E₂/GnRH signaling system

Raymundo Domínguez-Ordoñez^a, Marcos García-Juárez^a, Sandra Tapia-Hernández^a, Ailyn Luna-Hernández^a, Miriam Eli Galindo-Madrid^a, Miriam B. Tecamachaltzi-Silvarán^b, Kurt L. Hoffman^a, James G. Pfaus^{c,d}, Oscar González-Flores^{a,*}

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

^b Facultad de Ciencias para el Desarrollo Humano, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico

^c Department of Psychology and Life Sciences, Charles University, Prague, Czech Republic

^d Czech National Institute of Mental Health, Klecany, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:
Lordosis
Oxytocin
PGE₂
GnRH

ABSTRACT

Intracerebroventricular (icv) administration of oxytocin (OT) induces robust lordosis behavior (lordosis quotient and lordosis intensity) in estrogen-primed rats. The present study explored the hypothesis that the OT-Prostaglandin E₂-GnRH pathway (a pathway produced in astrocytes) is involved in the facilitation of lordosis behavior by icv infusion of OT (2 µg). In Experiment 1, we tested the involvement of the OT receptor (OTR) by infusion of the OTR antagonist, atosiban (ATO). OT-induced lordosis was significantly reduced at both 30 and 120 min by prior infusion of ATO. In Experiment 2, we studied the effects of aspirin (COX2 inhibitor) and ONO-AE3-208 (ONO; EP4 prostaglandin receptor antagonist) on OT-induced lordosis. Infusions of both compounds diminished OT-induced lordosis at both 120 and 240 min. In Experiment 3, the involvement of the GnRH-1 receptor inhibitor antide on OT-induced lordosis was evaluated. Antide significantly inhibited OT-induced lordosis at all times tested. These data indicate that the OT/PGE₂/GnRH pathway is involved in the expression of OT-induced lordosis behavior, an effect that may be occurring directly in hypothalamic astrocytes.

1. Introduction

It is generally accepted that lordosis behavior in gonadally-intact, cycling rats, and in ovariectomized (ovx) rats, is induced by the sequential actions of estradiol (E₂) and progesterone (Beach, 1976; Beyer et al., 2003; Boling and Blandau, 1939; McEwen et al., 1987; Pfaus et al., 2015). On the other hand, a series of pharmacological studies, initially conducted with non-steroidal agents such as gonadotropin-releasing hormone (GnRH; Moss and McCann, 1973) and prostaglandin E₂ (PGE₂; Rodríguez-Sierra and Komisaruk, 1977) also induced the expression of lordosis behavior in ovx E₂-primed rats like that induced by P. Furthermore, other compounds with different chemical structures can substitute the P to induces lordosis behavior when are also injected into E₂-primed rats (for review see: Beyer and González-Mariscal, 1986; Beyer et al., 2003; Blaustein, 2003; Mani and Blaustein, 2012; Micevych and Sinchak, 2007; Pfaus et al., 2015). These drugs include: (1) neurotransmitters, e.g., noradrenaline, dopamine, GABA,

acetylcholine; (2) small peptides e.g., oxytocin (OT), prolactin, leptin etc., (3) cyclic nucleotides, e.g., cAMP or cGMP etc.

Due to the diversity in the chemical structure of these agents, and the complex way in which they interact with neural networks, where none of them show an affinity for the progesterone receptor (PR) or the estrogen receptor (ER), it could be proposed that different mechanisms of action may be involved in the regulation of female sexual behavior in rodents (Beyer et al., 2003; Mani and Blaustein, 2012). However, these agents show similar latencies in inducing lordosis behavior as P, suggesting that there must be a mechanism at the subcellular level that is activated by all of these compounds despite their different chemical structures (Beyer et al., 2003; Domínguez-Ordoñez et al., 2015; García-Juárez et al., 2011, 2013; Mani and Blaustein, 2012). Thus, it is known that several of the mentioned agents act on their receptors located in the cell membrane and that they are coupled with G proteins, generating the activation of a cascade of intracellular events in rodents (Beyer et al., 2003; Mani and Blaustein, 2012). Based on this, a series of experiments

* Corresponding author at: Centro de Investigación en Reproducción Animal, Apartado Postal No 62, Tlaxcala, Tlax. 90000, Mexico.
E-mail address: oglezflo@gmail.com (O. González-Flores).

<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2021.105081>

Received 27 June 2021; Received in revised form 12 October 2021; Accepted 13 October 2021

Available online 26 October 2021

0018-506X/© 2021 Published by Elsevier Inc.

to explore the cellular mechanisms that could be participating in the regulation of the expression of female sexual behavior in estrogen-primed rats have been carried out. For example, the involvement of the GnRH receptor in the lordosis behavior induced by some of these agents has been explored. Thus, intracerebroventricular (icv) administration of the GnRH-1 receptor inhibitor, antide, reduced lordosis behavior induced by GnRH itself, progestins, leptin, E2 alone, or by vaginocervical stimulation (VCS), in estrogen-primed rats (Domínguez-Ordóñez et al., 2016; García-Juárez et al., 2011; Gómora-Arrati et al., 2008; Kauffman and Rissman, 2004). On the other hand, several protein kinases have also been evaluated, e.g., intracerebral administration of the PKA inhibitor RpAMPS, the MAPK inhibitor PD98059, the PKG inhibitor KT5823 reduced lordosis induced by progestins, GnRH, PGE₂, leptin, etc., (Acosta-Martínez et al., 2006; Chu and Etgen, 1997; Chu et al., 1999; Etgen and Acosta-Martínez, 2003; García-Juárez et al., 2012; García-Juárez et al., 2013; González-Flores et al., 2006; González-Flores et al., 2009; Kow and Pfaff, 2004; Mani et al., 2000; Ramírez-Orduña et al., 2007).

A number of groups showed that OT facilitates lordosis when injected intracerebrally (Arletti and Bertolini, 1985; Caldwell et al., 1986; Gorska and Lester, 1987), in the ventromedial hypothalamus (Schulze and Gorska, 1991; Schumacher et al., 1989) or in the preoptic area (Caldwell et al., 1989; Schulze and Gorska, 1991). This effect is likely mediated by the OT receptor (OTR) since the administration of selective OTR antagonist (Pedersen and Boccia, 2002), or by antisense DNA of the OTR (McCarthy et al., 1994) reduced lordosis behavior. Furthermore, in estrogen and P-primed receptive rats, administration of OTA, an OT antagonist, significantly reduced lordosis (Witt and Insel, 1991).

It has now been demonstrated that OT is a potent stimulator of the synthesis and release of PGE₂ and GnRH, respectively, from the POA-hypothalamic system (Parent et al., 2008). In support of this idea is that both OT and its receptor increase in these brain areas at the time of puberty and subsequently in the evening on the day of estrus (Caligioni et al., 2007). However, it was proposed that OT might have an indirect effect on GnRH release since GnRH neurons do not express OTR, which might suggest that the stimulatory effect of OT on neurons would require to be mediated by another system. Thus, elegant experiments initially performed by Ojeda et al. (1977a, 1977b) showed that prostaglandins were neuroactive substances that regulated GnRH secretion in the hypothalamus. For example, a study made in ovx estrogen-primed rats showed that injection of PGE₂ into the POA or hypothalamus induced the secretion of LH (Ojeda et al., 1977b).

The effect of PGE₂ can be exerted on four receptor subtypes (EP 1 to 4) coupled to G proteins capable of activating the formation of various second messengers (Coleman et al., 1994; Sugimoto and Narumiya, 2007). For example, activation of the EP1 receptor by PGE₂ induces an increase in intracellular free Ca²⁺ (Katoh et al., 1995; Sugimoto and Narumiya, 2007), while activation of EP2 and EP4 receptors activate Gs proteins which causes an increase in intracellular cAMP levels (Cassadonte et al., 2011; Sugimoto and Narumiya, 2007).

Interestingly, recent studies support the idea that OTR located on the membrane of hypothalamic astrocytes when activated by OT induces the synthesis of PGE₂ (Parent et al., 2008). PGE₂ acts as a gliotransmitter, strongly potentiating the release of GnRH by hypothalamic neurons. Therefore, in the present experiments, we hypothesized that OT induces lordosis through activation of the OT/PGE₂/GnRH pathway. In the first experiment, we assessed the effectiveness of lordosis facilitation by icv administration of OT and the effect of atosiban (ATO, a competitive OTR antagonist) on OT-induced lordosis. The second experiment evaluated the effect of aspirin (inhibitor of COX enzymes responsible for PGE₂ synthesis), and the PGE₂ receptor EP4 antagonist, ONO-AE3-208 on OT-induced lordosis. Finally, in the third experiment, we evaluated the effects of icv antide (a GnRH-1 receptor antagonist) on OT-induced lordosis behavior.

2. Methods

2.1. Animals

Seventy-five sexually inexperienced female Sprague Dawley rats weighing between 230 and 250 g and bred in our colony were used in these experiments. They were housed in collective cages (4 animals per cage) with a thin layer of wood shavings in a colony room maintained under controlled light/dark conditions (14 h of light and 10 h of dark) and at a temperature of $21 \pm 2^\circ\text{C}$. All animals were fed Purina rat chow and water ad libitum.

2.2. Surgical procedures

All females were anesthetized (see below) and ovariectomized bilaterally. After recovery, females were housed in groups of 4 in acrylic cages. Two weeks later they were anesthetized and placed in a Kopf stereotaxic instrument (Tujunga, CA, USA) for implantation of a stainless-steel cannula (22-gauge, 17 mm length) into the right lateral ventricle following coordinates from the atlas of Paxinos and Watson (2006); antero-posterior +0.80 mm, mediolateral 1.5 mm, dorsoventral -3.5 mm respect to bregma. A stainless-steel screw was fixed to the skull, and both cannula and screw were secured with dental cement. Following cannula implantation, females were housed in individual cages to prevent agonistic interactions (e.g., biting). All surgical procedures were done under xylazine (4 mg/kg) and ketamine (80 mg/kg) anesthesia and followed by subcutaneous injection of carprofen (5 mg/kg/24 hr \times 3 days oc) to prevent pain; Immediately after cannula implantation, females were intramuscular (i.m.) injected with procainic benzilpenicilin (22,000 IU/kg) and cristaline benzilpenicilin (7500 IU/Kg) each 24 h by 3 days. A dummy cannula (30 gauge) provided with a cap was introduced into the guide cannula to prevent clogging and contamination. 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 CINVESTAV.

2.3. Testing procedures

Lordosis behavior tests (receptivity and lordosis score) were done by placing females in a circular plexiglas arena (53 cm in diameter). A total of 18 sexually active males were used for this experiment. However, in each test, six arenas were used with one male (the other 12 males remained in holding cages), therefore the female was changed with different males until she received 10 vigorous mountings, with or without penile intromission. Due to the extensive sexual experience of the males prior to the experiment, the test lasted less than 10 min, however, if any of them ejaculated or did not mount the female, they were removed from the arena and replaced by a new male. Receptivity for all females was determined as a lordosis quotient [LQ = (number of lordosis / 10 mounts) \times 100]. While the intensity of lordosis (0 to 3) was quantified according to the lordosis score (LS) proposed by Hardy and DeBold (1971). This scale ranged from 0 to 3 for each response and, consequently, from 0 to 30 for each female that received ten mounts from the male. In all experiments, the females were tested at 30, 120, and 240 min after icv OT infusion. Lordosis behavior was scored live and observers were blinded as to the treatment condition at each of the times tested.

2.4. Chemicals and administration

Estradiol benzoate (EB), OT (Cys²-Tyr³-Ile⁴-Gln⁵-Asn⁶-Cys⁷-Pro⁸-Leu⁹-Gly¹⁰-NH₂), and the selective OTR antagonist, atosiban (ATO; C₄₃H₆₇N₁₁O₁₂S₂) were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO). Aspirine (acetylsalicylic acid, COX1-COX2 inhibitor) was purchased from Tocris Bioscience (Bristol, UK). ONO-AE3-208, (ONO; an EP4 receptor antagonist) was purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan).

All chemicals were infused in a volume of 1 μ l through a plastic Clay Adams catheter (PE 10 No 7401), fitted to a Hamilton syringe (10 μ l) that was inserted into the guide ventricular cannula. EB was administered subcutaneously (sc).

2.5. Experiments

2.5.1. Experiment 1. Effect of icv infusion of OT and ATO on lordosis behavior in ovx, EB primed rats

This experiment was designed to assess the involvement of OT and its receptor in the facilitation of lordosis in EB-primed rats. One week after icv cannulation, 32 rats were injected sc with EB (5 μ g). A positive OT group of 10 animals was infused with saline (39.5 h: ATO solvent) and 30 min later (i.e., 40 h after EB injection) received 2 μ g of OT. The role of the OTR was tested in a second group of 12 females by infusing 1.5 μ g of ATO at 39.5 h post EB, while at 40 h OT was infused icv. The negative control group of 10 females received 1 μ l of two saline infusions, one at 39.5 h post EB, and a second at 40 h.

EB was dissolved in sesame oil to a concentration of 50 μ g/ml, therefore each female received 5 μ g/0.1 ml. OT was dissolved in saline to a concentration of 2 μ g/ μ l. This dose chosen was based on a previous *in vivo* study (Caldwell et al., 1986). ATO was prepared in saline at a concentration of 0.5 μ g/ μ l. This concentration was chosen based on a previous study of our laboratory (Gómora-Arrati et al., 2019).

2.5.2. Experiment 2. Effect of icv administration of aspirin or ONO on lordosis behavior augmented by OT

The objective of this experiment was to evaluate the participation of COX-2 (responsible enzymes for PGE2 synthesis) and EP-4 prostaglandin receptor in female lordosis behavior facilitated by OT.

One week after the intracerebral implant, 35 rats received a sc injection of EB (5 μ g). To explore the involvement of COX-2 on OT-induced lordosis, 9 females were injected with 30 μ g of aspirin (COX2 inhibitor) at 39.5 h post EB and at 40 h were infused with 2 μ g OT. To test the involvement of the EP4 receptor on OT-induced lordosis, 7 animals were infused with ONO (EP4 prostaglandin receptor antagonist) at 39.5 h post EB and at 40 h they received 2 μ g OT. For the positive OT control, 10 females received DMSO at 39.5 h post EB and OT (2 μ g) at 40 h. The negative control group of 9 females received an icv infusion of DMSO at 39.5 h and at 40 h received an infusion of 1 μ l of saline.

Aspirin and ONO were dissolved in 10% DMSO at a concentration of 30 μ g/ μ l and 1 μ g/ μ l respectively. These doses were chosen based on previous studies of systemic administration of Aspirin 30 mg intravenously (Nakada, 2021) and ONO 10 mg/kg interperitoneally (Xu et al., 2014), and adjusted for icv infusion.

2.5.3. Experiment 3. Effect of icv administration of antide on lordosis behavior elicited by OT

To assess the participation of GnRH-1 receptors on lordosis behavior induced by OT in EB-primed rats we used the GnRH-1 receptor antagonist antide. One week after icv cannulae implantation, 8 rats were injected sc with EB (5 μ g) and at 39.5 h post EB with antide, followed at 40 h by 2 μ g of OT. Antide was dissolved in saline to a concentration of 1 μ g/ μ l. The dose of antide was selected because it blocked the behavioral effects of GnRH in several studies (Domínguez-Ordóñez et al., 2018; García-Juárez et al., 2011; Kauffman and Rissman, 2004). For statistical purposes and in order to reduce the number of animals used in the experiment, we compared the behavioral responses of animals who received antide + OT to those that received saline + OT from Experiment 1.

2.6. Histological confirmation of cannula placement

Twenty-four hours after completion of the experiments, females were euthanized with Xylazine and Ketamine overdose, and 1% methylene blue was administered through the cannula. The brain was

removed and sectioned in the transverse plane to verify the cannula position in the right lateral ventricle.

2.7. Statistical analysis

In order to evaluate the effects of the different treatments on lordosis behavior, the responses obtained were compared as described below. Since group sizes were relatively small and data (lordosis score, lordosis quotient) were not continuous, we applied non-parametric statistics. The independent variable was pharmacological treatment; dependent variables were lordosis score and lordosis quotient. Behavioral responses were measured at 3 time points, 30, 120, and 240 min after administration of OT, but possible effects of time on behavioral responsiveness were not formally tested in the present analysis. Therefore, data from each time point were analyzed independently using a Kruskal-Wallis test. Post-hoc comparisons were made using Mann Whitney *U* tests, applying a Bonferroni correction. The Bonferroni-corrected *p* value was calculated in two separate series considering 3 possible pairwise comparisons (based on the solvent used for inhibitors) for each series on the next order: a) Saline + OT vs Saline + Saline; Saline + OT vs ATO + OT; Saline + OT vs Antide + OT. b) DMSO + OT vs DMSO + Saline; DMSO + OT vs Aspirin + OT; DMSO + OT vs ONO + OT. Thus, pairwise comparisons were considered significant where $p < 0.016$ ($0.05/3 = 0.016$). The Mann Whitney *U* test is an excellent alternative to the *t*-test with a power efficiency of 95.5% of the parametric test (Siegel and Castellan, 1995). Effect sizes for Mann Whitney *U* comparisons (Cohen's *d*) were calculated using an online calculator (https://www.psychometrica.de/effect_size.html, Berben et al., 2012; Ivarsson et al., 2013) based on the procedure of Lenhard and Lenhard (2016). Planned pairwise comparisons were as follows: In Experiment 1, the control group treated with saline was compared with the group treated with OT, which in turn was compared with the group treated with OT plus ATO. For Experiment 2, the control group treated with DMSO was compared to the group treated with OT, which in turn was compared with the groups treated with OT plus aspirin or OT plus ONO AEB-208. In Experiment 3 the control group treated with physiological saline was compared to the one treated with OT, which in turn was compared with the group treated with OT plus antide.

3. Results

3.1. Experiment 1. Effect of icv infusion of OT and ATO on lordosis behavior of ovx, EB primed rats

Fig. 1 shows both the LQ (A) and LS (B) obtained at 30, 120, and 240 min after icv injection of 2 μ g of OT. The Kruskal-Wallis test showed that both LQ and LS were significantly different only at 120 (for LQ $p < 0.001$, and LS $p < 0.004$). Post-hoc Mann-Whitney *U* showed that OT elevated LQ significantly only at 120 and 240 min ($p < 0.01$) after infusion, whereas for LS there was only a significant difference at 120 min ($p < 0.01$). Co-administration of the OTR antagonist ATO reversed the increased LQ induced by OT at 120 ($p < 0.001$) min and the LS at 120 ($p < 0.01$). Effect size results (Table 1) showed that the largest effect sizes occurred at 120 and 240 min for Saline + Saline vs Saline vs OT and at 120 min for Saline + OT vs ATO + OT compared groups, consistent with the statistical analyses.

3.2. Experiment 2. Effect of icv administration of aspirin or ONO on lordosis behavior elicited by OT

Significant differences between DMSO + Saline, DMSO + OT and DMSO + Aspirin treatments were detected by the Kruskal-Wallis test for LQ at 120 ($p < 0.001$) and 240 min ($p < 0.0003$); similar results were obtained for LS at 120 ($p < 0.002$) and 240 min ($p < 0.0007$). These results were confirmed by the Mann-Whitney *U* test, which showed that lordosis behavior (LQ: A) and LS (B) induced by 2 μ g of OT ($n = 7$) was

Figure 1

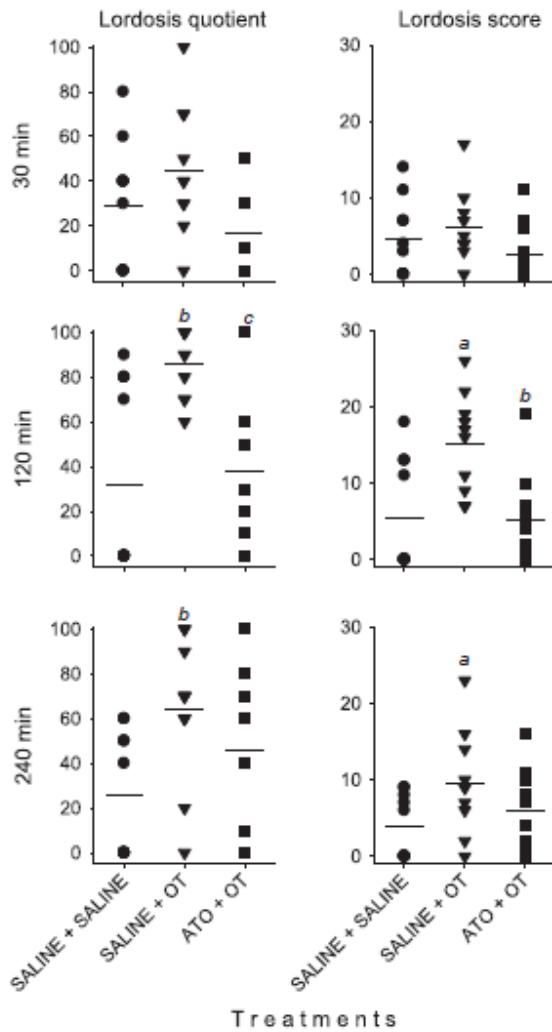


Fig. 1. Oxytocin (OT, 2 µg; n = 10) elicited lordosis behavior, in ovx- EB-primed rats, LQ (A) at 120 and 240 min and LS (B) at 30 and 120 min after its ICV injection when compared with the group who received its vehicle, Saline + Saline (1 µl; n = 10). This behavior, LQ (A) and LS (B), was diminished by ATO (1.5 µg; n = 12) infused ICV. Saline + Saline vs Saline + OT **p* < 0.05; †*p* < 0.01; ‡*p* < 0.001. Saline + OT vs ATO + OT **p* < 0.05; †*p* < 0.01; ‡*p* < 0.001.

significantly different at the three times tested, 30 min (*p* < 0.01), 120 and 240 min (*p* < 0.001) than that of females who received DMSO + Saline (n = 10). However, icv administration of aspirin given 30 min before OT infusion (see Fig. 2) prevented the stimulatory effect of OT at 120 and 240 min for LQ (*p* < 0.01).

When data from the comparison between DMSO + Saline, DMSO + OT and DMSO + ONO for LQ were analyzed with the Kruskal-Wallis test, statistically significant differences were found at 30 (*p* < 0.011), 120 (*p* < 0.0008), and 240 min (*p* < 0.001). Moreover, for LS between these comparisons revealed statistical differences at 120 (*p* < 0.0007) and

Table 1
Effect size for lordosis behavior in all experiments.

Compared groups	Effect size (<i>d</i>) at three tested times, min		
	30	120	240
1. Saline vs OT	0.48	1.53	1.5
2. OT vs Atosiban	1.13	2.01	0.43
3. DMSO vs OT	2.01	3.16	3.16
4. OT vs Aspirin	1.32	2.02	2.54
5. OT vs ONO AEB-208	1.29	2.08	2.14
6. OT vs Antide	2.22	3.06	2.22

OT; Oxitocin; DMSO; Dimethylsulfoxide.

Figure 2

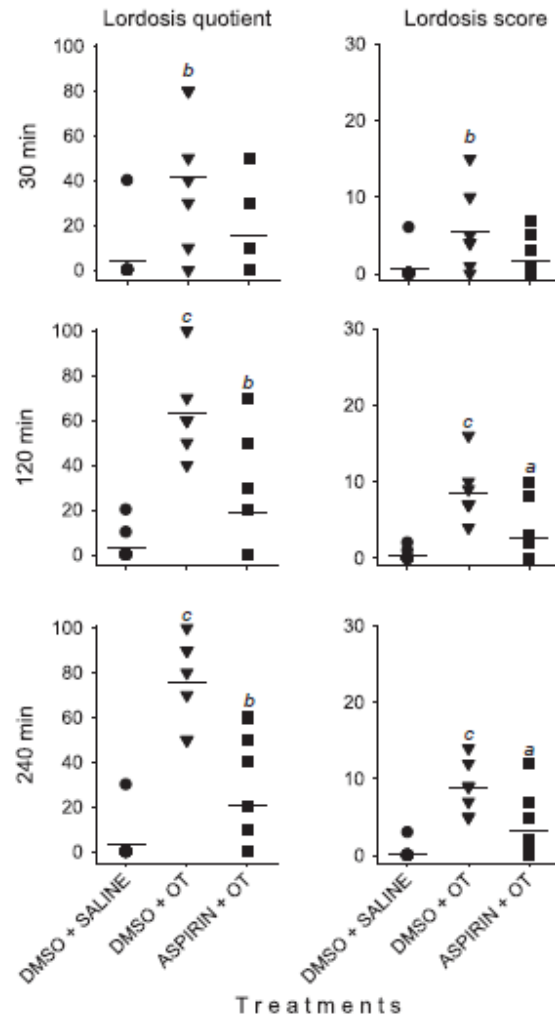


Fig. 2. Lordosis behavior, LQ (A) or LS (B) was facilitated by ICV injection of OT (2 µg; n = 7) in ovx EB-primed rats at the three times tested when compared with DMSO + Saline (1 µl; n = 10) control group. This behavioral effect, LQ (A) or LS (B), was statistically diminished by ICV infusion of Aspirin (30 µg; n = 9) at 120 and 240 min. DMSO + Saline vs DMSO + OT **p* < 0.05; †*p* < 0.01; ‡*p* < 0.001. DMSO + OT vs Aspirin + OT **p* < 0.05; †*p* < 0.01; ‡*p* < 0.001.

240 min ($p < 0.001$). As shown in Fig. 3, ONO infused 30 min before OT also diminished both LQ and LS at 120 and 240 min ($p < 0.01$ for both). Finally, analysis of effect size showed important differences among all groups and treatments; however, the largest effect sizes occurred at 120 and 240 min at 120 and 240 min (Table 1).

3.3. Experiment 3. Effect of icv administration of antide on lordosis behavior elicited by OT

The Kruskal Wallis test revealed statistical differences at the three times tested for both LQ [30 ($p < 0.007$), 120 ($p < 0.0005$) and 240 ($p <$

0.001)] and LS [30 ($p < 0.008$), 120 ($p < 0.0009$) and 240 ($p < 0.003$)]. Mann-Whitney *U* tests showed significant differences at the three times tested ($p < 0.001$). As shown in Fig. 4, administration of 1 μ g of antide ($n = 8$) blocked LQ and LS elicited by OT in ovx, EB-primed rats at three times tested ($p < 0.001$ for each). These results are supported by the effect size analysis, which shows that the differences between the means of the control group versus the experimental group are large at the three times analyzed, however, the maximum effect size occurred at 120 min (Table 1).

Figure 3

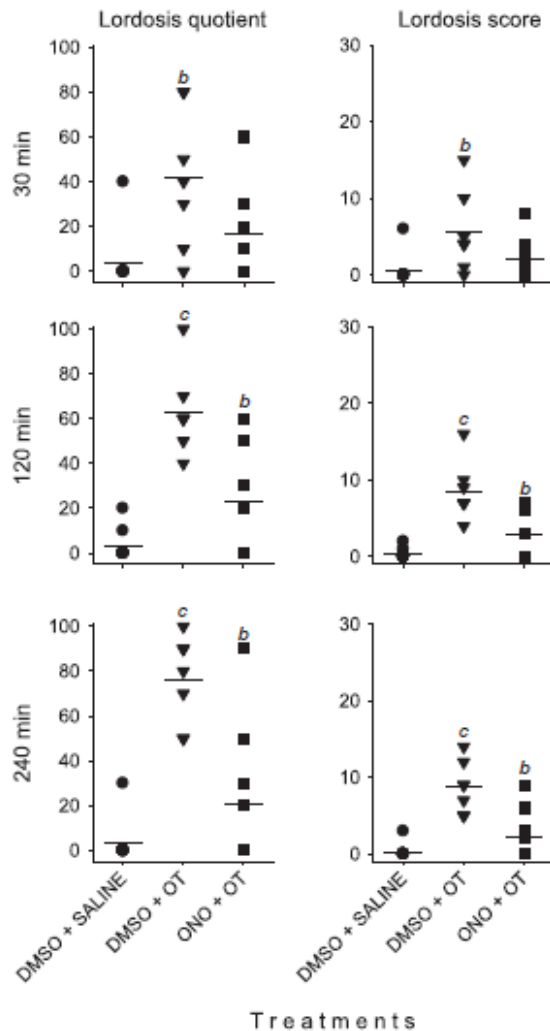


Fig. 3. Lordosis behavior, LQ (A) or LS (B) was facilitated by ICV injection of OT (2 μ g; $n = 7$) in ovx EB-primed rats at the three times tested when compared with DMSO + Saline (1 μ g; $n = 10$) control group. This behavioral effect, LQ (A) or LS (B), was statistically decreased by ICV infusion of ONO-AE3-208 (ONO, 1 μ g; $n = 9$) at 120 and 240 min. DMSO + Saline vs DMSO + OT $^a p < 0.05$; $^b p < 0.01$; $^c p < 0.001$. DMSO + OT vs ONO + OT $^a p < 0.05$; $^b p < 0.01$; $^c p < 0.001$.

Figure 4

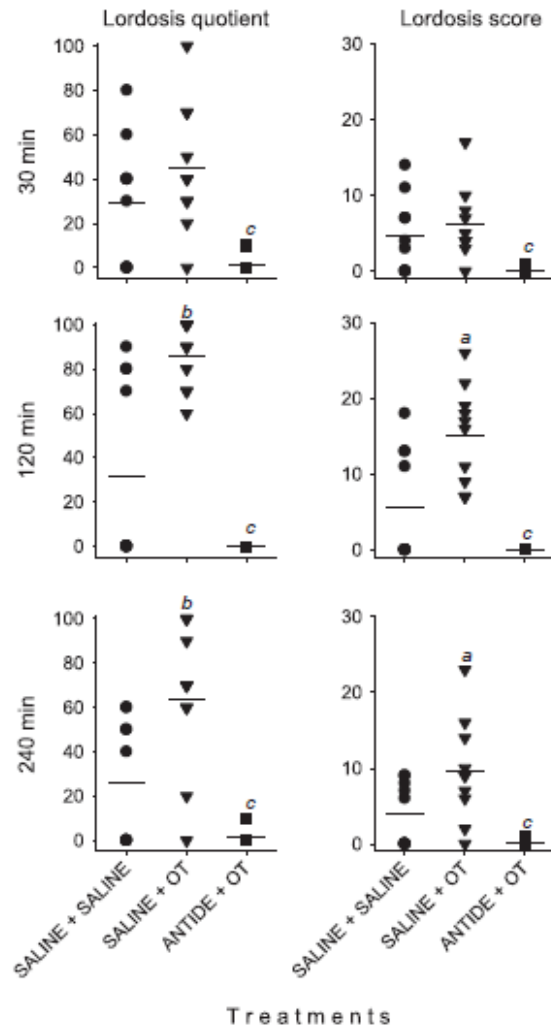


Fig. 4. Antide (1 μ g; $n = 8$) infused ICV, blocked statistically lordosis behavior facilitated by intracerebral injection of OT (2 μ g; $n = 10$) in ovx EB primed rats at the three times tested. Saline + Saline vs Saline + OT $^a p < 0.05$; $^b p < 0.01$; $^c p < 0.001$. Saline + OT vs Antide + OT $^a p < 0.05$; $^b p < 0.01$; $^c p < 0.001$.

4. Discussion

The present results support and extend previous results showing that intracerebral administration of OT induces lordosis behavior in EB-primed rats (Arletti and Bertolini, 1985; Caldwell et al., 1986; Caldwell et al., 1989; Gorska and Lester, 1987; Schulze and Gorska, 1991; Schumacher et al., 1999). While PGE₂ and GnRH-induced lordosis behavior have also been widely documented (Beyer et al., 1997; Buntin and Liak, 1979; Lima-Hernández et al., 2014; Ramírez-Orduña et al., 2007), the results of this study are novel since icv administration of the OTR antagonist atosiban, the COX-2 inhibitor aspirin, the PGE₂ receptor EP4 antagonist ONO, and the GnRH receptor antagonist antide, all significantly decreased lordosis behavior induced by OT in EB-primed rats. These data support the hypothesis that the OT/PGE₂/GnRH pathway is involved in OT-induced lordosis. Thus, in our most recent experiments, we have proposed that lordosis behavior induced by a variety of compounds occurs through the release of GnRH as it should coincide with ovulation (Domínguez-Ordóñez et al., 2018; García-Juárez et al., 2011; Lima-Hernández et al., 2012).

It has been proposed that OT promotes pulsatile GnRH release indirectly through PGE₂ (Clasadonte et al., 2011; Ojeda et al., 1977a, 1977b, 1979). For example, in vivo studies in rats treated with steroid hormones (Ojeda et al., 1977a, 1977b, 1979), and in vitro (Clasadonte et al., 2011) studies performed with hypothalamic and POA fragments, showed that PGE₂ stimulated both GnRH and LH secretion (Bigdeli and Snyder, 1978; Ojeda et al., 1975; Ojeda and Negro-Vilar, 1985; Ojeda et al., 1977b). Conversely, inhibition of PGE₂ synthesis suppressed noradrenaline-induced GnRH secretion (Ojeda et al., 1979, 1982; Heulme and Dray, 1984). However, the cellular mechanisms through which OT exerts lordosis behavior have been unclear. The current findings suggest that this could be through the same mechanism by which ovulation is induced, since it is now known that the axons of OT neurons project from the supraoptic and paraventricular nuclei to the median eminence and hypothalamus, an area involved in the expression of lordosis behavior (Armstrong, 2015; Mani and Blaustein, 2012). Furthermore, the concentration of OT mRNA increases in the paraventricular nucleus during the treatment of EB + P (Amico et al., 1997) and the facilitation of sexual behavior is dependent of P in EB primed rats (Gorska and Lester, 1987), and was greatest during paced mating conditions (Nyuyki et al., 2011). Furthermore, the synthesis of OTRs depends on the activation by estradiol of ER α (Young et al., 1998), with subsequent P unmasking synthesized OTRs in the ventrolateral VMH, bringing them into physical contact with OT axon terminals (Schumacher et al., 1992). However, it is well established that estradiol priming is capable of regulating a variety of specific genes that require the activation of ER. Some of the activated genes that have been linked to the expression of lordosis behavior in addition to OT (Miller et al., 1989; Bale et al., 1995; Quinones-Jenab et al., 1997; Young et al., 1998, 2003) are progesterone receptors (PR, Mani and Blaustein, 2012), GnRH receptors (Petersen et al., 1993, 1995), mu-opioid receptors (Eckersell et al., 1998; Quinones-Jenab et al., 1997; Zhouab and Hammer, 1995), and some others such as those for different catecholamines (Melis and Argiolas, 1995). Because lordosis can be induced by compounds that produce similar or different intracellular signals, such as second messengers and protein kinases that induce the activation of these proteins when they are phosphorylated, the existence of molecular cross talk between these mechanisms has been proposed, with PR as a common modulator (Beyer et al., 2003; Mani and Blaustein, 2012).

For OT to ultimately cause the release of GnRH, a series of steps are required starting with the activation of OTR and the subsequent synthesis of PGE₂, a process that has been shown to occur in astrocytes adjacent to hypothalamic neurons (Clasadonte et al., 2011). Once released, PGE₂ should act on its receptors, some of which are located on GnRH neurons to lead to the synthesis and release of GnRH. This would then act on GnRH-1 receptors on a variety of neurons. This is supported in the present experiments given that the OTR antagonist atosiban

reduced lordosis behavior induced by OT. OTR is a G protein-coupled receptor where binding with its natural ligand activates a cascade of signaling events including phospholipase C and COX-2 (Jurek and Neumann, 2018). In a series of experiments in gonadally intact female rats, intracerebral administration of various OT antagonists to the lateral ventricle, preoptic area, or ventral tegmental area, blocked lordosis behavior induced by combined EB and P (Benelli et al., 1994; Caldwell et al., 1994; Frye and Walf, 2010; Pedersen and Boccia, 2002).

Interestingly, icv administration of aspirin (inhibitor of both COXs isoforms) reduced the stimulatory effects of OT on lordosis in EB-primed rats. The cellular mechanism by which aspirin exerts its effect is through inhibiting the biosynthesis of cyclic prostanooids which are generated by the metabolism of arachidonic acid through the activity of cyclooxygenase (Awtry and Loscalzo, 2000). It is therefore possible that the inhibition of lordosis by OTR antagonists could be due to a blockade of PGE₂ synthesis. In support of this idea, we found that indomethacin, another cyclooxygenase inhibitor, reduced lordosis behavior induced by a variety of ring-A reduced progestins (Beyer et al., 1999).

The role of the EP4 receptor has also been examined in different physiological and reproductive responses. For example, it is known that PGE₂ increases in cAMP turnover through the activation of this receptor (Coleman et al., 1994). This induces several physiological responses, including the induction of angiogenesis through cAMP and PKA ζ (Zhang and Daaka, 2011) and vascular relaxation mediated by cAMP, PKA and endothelial nitric oxide synthase (Hristovska et al., 2007). From a behavioral point of view, it has been found that the EP4 receptor participates in the suppression of food intake in mice (Ohinata et al., 2006), and the inhibition of this receptor improves cognitive function in a mouse model of Alzheimer's disease (Hoshino et al., 2012). In addition, it has been shown that activation of EP4 by PGE₂ induces activation of PKC and p38 MAPK (Fiebich et al., 2001). In a series of studies performed in our laboratory we showed that both lordosis and proceptive behaviors induced by PGE₂ in EB-primed rats were reduced by intracerebral administration of inhibitors of different protein kinases, such as RpAMPS, PKA inhibitor, KT5823, PKC inhibitor and PD98059, MAPK inhibitor (González-Flores et al., 2009; Ramírez-Orduña et al., 2007). Therefore, with these results and those obtained in the present experiments, it could be concluded that OT-induced lordosis occurs through different intracellular pathways which could be activated by EP4, since icv administration of ODO reduced this effect.

It is logical to think that the release of GnRH is one of the most important factors in the induction of female sexual behavior since both coincide with the time of ovulation to ensure fertilization of the ovum (Pfaus et al., 2015). As mentioned above, although a large number of substances that facilitate lordosis trigger the release of GnRH, GnRH neurons do not contain receptors for those compounds. This suggests strongly that an indirect mechanism must be involved in the release of GnRH from hypothalamic neurons. Accordingly, we found that intracerebral administration of antide blocked lordosis behavior induced by reduced A-ring progestins, GnRH, PGE₂, leptin, G1 (a OPR-1 agonist), and by VCS (García-Juárez et al., 2020; García-Juárez et al., 2011; Domínguez-Ordóñez et al., 2018; Gómez-Arrati et al., 2008). The results of the present work coincide with those as antide also blocked OT-induced lordosis through a series of processes that result in the release of GnRH from GnRHergic neurons activating their GnRH-1 receptors in the hypothalamus trigger the expression of lordosis behavior (see Fig. 5).

Finally, Fig. 5 proposes a model of paracrine communication between astrocytes and GnRH neurons that affects the regulation of sexual behavior in the female rat. This is based on the present findings given that ATO, aspirin, ONO, and antide, inhibited OT-induced lordosis. Astrocytes are known to contain membrane OTRs, which when activated by OT, lead to the activation of the COX-2 enzyme, which in turn metabolizes arachidonic acid into PGE₂. Astrocyte-derived PGE₂ activates EP4 receptors, which then activate an AMPc/PKA pathway in GnRH neurons. The release of PGE₂ from astrocytes would then activate EP4 receptors located on GnRH neurons leading to the release of GnRH

Figure 5

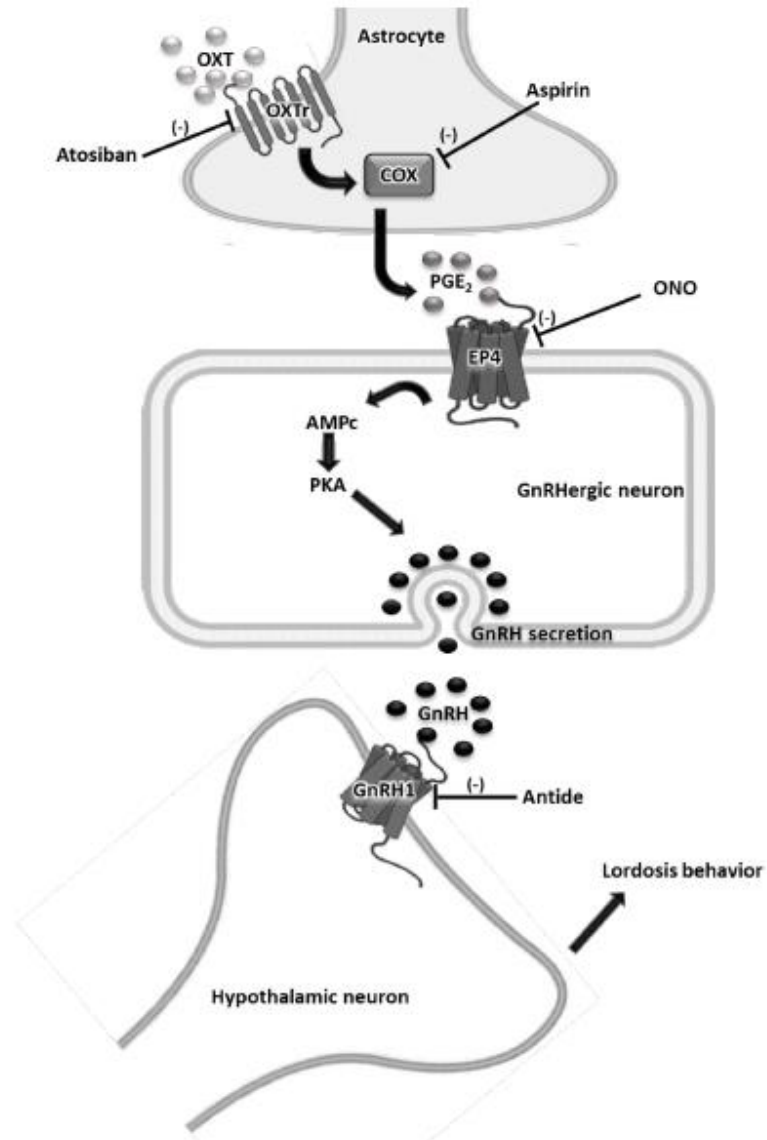


Fig. 5. Model of paracrine communication between astrocytes and GnRH neurons on the regulation of female sexual behavior in the rat. Astrocytes are known to contain membrane OTR, which when activated by its own ligand, i.e. OT, producing the activation of COX-2 enzyme which metabolizes arachidonic acid into PGE₂. Astrocyte-derived PGE₂ activates EP4 receptors and subsequent activation of an AMPc/PKA pathway in GnRH neurons. The release of PGE₂ from astrocyte, will activate its EP4 receptors located on GnRH neurons leading to the release of GnRH which will induce lordosis behavior. The results of the present experiment favor this pathway between astrocytes and GnRH cells, since the use of the different antagonists and inhibitors, such as ATO, aspirin, ONO and antide, inhibited OT-induced lordosis behavior.

which by acting on the GnRH-1 receptor would participate both in the induction of ovulation and in the display of female sexual behavior. Although this simple molecular model explains the generation of estrous behavior by OT from astrocytes, a more complex picture with a larger number of substrates must be considered, including the influence exerted by P on OT regulation. For example, it has been proposed that P increases both the binding of OT to its receptor and lordosis when infused into the caudal part of the hypothalamus where estradiol-induced oxytocin receptors are modulated by P (Schumacher et al., 1990).

In conclusion, the present results extend knowledge that the actions of different hormones in the brain can be generated in both neurons and glial cells. Indeed, the same receptors for agents that induce both proceptive and receptive female sexual behaviors, such as melatonin, thyroid hormone, steroid hormones, OT, leptin, growth factors, etc., are also located in or on glial cells (Cipolla-Neto and do Amaral, 2018; Fujita and Yamashita, 2019; Melcangi et al., 2001; Moháczik et al., 2011; Tanker et al., 2012). Garcia-Segura proposed that glial cell function could be regulated by hormones that, by acting directly on the glia, generate signals that are sent to neurons to modulate their function (García-Segura and McCarthy, 2004; García-Segura and Melcangi, 2006). The effect on the neuron can produce the secretion of a transmitter, neurohormone, or growth factors.

Declaration of competing interest

None of the authors has a conflict of interest of any kind in the conduct and reporting of this research.

Acknowledgements

This research was supported by Fondo Sectorial de investigación para la Educación del CONACYT, grant number CB-255936/2015.

References

Acosta-Martínez, M., González-Flores, O., Etgen, A.M., 2006. The role of progesterone receptors and the mitogen-activated protein kinase pathway in δ opioid receptor facilitation of female reproductive behaviors. *Horm. Behav.* 49, 458–462. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.10.002>.

Amico, J.A., Thomas, A., Hollingshead, D.J., 1997. The duration of estradiol and progesterone exposure prior to progesterone withdrawal regulates oxytocin mRNA levels in the paraventricular nucleus of the rat. *Endocr. Res.* 23, 141–156. <https://doi.org/10.3109/07435809709031849>.

Arletti, R., Bertolini, A., 1985. Oxytocin stimulates lordosis behavior in female rats. *Neuropeptides* 6, 247–253. [https://doi.org/10.1016/0143-4179\(85\)90095-2](https://doi.org/10.1016/0143-4179(85)90095-2).

Armstrong, W.E., 2015. Hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei. In: Paxinos, G. (Ed.), *The Rat Nervous System*, fourth ed. Elsevier Inc., Sidney, pp. 295–314. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374245-2.00014-0>.

Awtry, E.H., Loscalzo, J., 2000. Aspirin. *Circulation* 101, 1206–1218. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.10.1206>.

Bale, T.L., Dorsa, D.M., Johnston, C.A., 1995. Oxytocin receptor mRNA expression in the ventromedial hypothalamus during the estrous cycle. *J. Neurosci.* 15, 5058–5064. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-07-05058.1995>.

Beach, F.A., 1976. Sexual attractiveness, proceptivity, and receptivity in female mammals. *Horm. Behav.* 7, 105–138. [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(76\)90008-8](https://doi.org/10.1016/0018-506X(76)90008-8).

Bendili, A., Poggioli, R., Luppi, P., Ruini, L., Bertolini, A., Arletti, R., 1994. Oxytocin enhances, and oxytocin antagonism decreases, sexual receptivity in intact female rats. *Neuropeptides* 27, 245–250. [https://doi.org/10.1016/0143-4179\(94\)90005-1](https://doi.org/10.1016/0143-4179(94)90005-1).

Berben, L., Sereika, S.M., Engberg, S., 2012. Effect size estimation: methods and examples. *Int. J. Nurs. Stud.* 49, 1039–1047. <https://doi.org/10.1016/j.ijnurstu.2012.01.015>.

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. *Scand. J. Psychol.* 44, 221–229. <https://doi.org/10.1111/j.1467-9450.00339>.

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 proceptive behaviours in rats. *J. Neuroendocrinol.* 9, 609–614. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.1997.00617.x>.

Beyer, C., González-Flores, O., Ramírez-Orduña, J.M., González-Mariscal, G., 1999. Indomethacin inhibits lordosis induced by ring a-reduced progesterone: possible role of 3 α -oxoreduction in progesterone-facilitated lordosis. *Horm. Behav.* 35, 1–8. <https://doi.org/10.1006/hbeh.1998.1457>.

Beyer, C., González-Mariscal, G., 1986. Elevation in hypothalamic cyclic AMP as a common factor in the facilitation of lordosis in rodents: a working hypothesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 474, 270–281. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1986.tb28018.x>.

Bigdeli, H., Snyder, P.J., 1978. Gonadotropin-releasing hormone release from the rat hypothalamus: dependence on membrane depolarization and calcium influx. *Endocrinology* 103, 281–286. <https://doi.org/10.1210/endo-103-1-281>.

Blaustein, J.D., 2003. Progesterone receptors: neuronal integrators of hormonal and environmental stimulation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1007, 238–250. <https://doi.org/10.1196/annals.1286.023>.

Boling, J.L., Blandau, R.J., 1939. The estrogen-progesterone induction of mating responses in the spayed female rat. *Endocrinology* 25, 359–364. <https://doi.org/10.1210/endo-25-3-359>.

Buntin, J.D., Lisk, R.D., 1979. Prostaglandin E₂-induced lordosis in estrogen-primed female hamsters: relationship to progesterone action. *Physiol. Behav.* 23, 569–575. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(79\)90057-X](https://doi.org/10.1016/0031-9384(79)90057-X).

Caldwell, J.D., Jirkowski, G.F., Greer, E.R., Pedersen, C.A., 1989. Medial preoptic area oxytocin and female sexual receptivity. *Behav. Neurosci.* 103, 655–662. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.103.3.655>.

Caldwell, J.D., Johns, J.M., Faggin, S.M., Senger, M.A., Pedersen, C.A., 1994. Infusion of an oxytocin antagonist into the medial preoptic area prior to progesterone inhibits sexual receptivity and increases rejection in female rats. *Horm. Behav.* 28, 288–302. <https://doi.org/10.1006/hbeh.1994.1024>.

Caldwell, J.D., Frange, A.J., Pedersen, C.A., 1986. Oxytocin facilitates the sexual receptivity of estrogen-treated female rats. *Neuropeptides* 7, 175–189. [https://doi.org/10.1016/0143-4179\(86\)90093-4](https://doi.org/10.1016/0143-4179(86)90093-4).

Calligaris, C.S., Oliver, C., Jansur, M.C., Franci, C.R., 2007. Presence of oxytocin receptors in the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in female rats: a possible direct action of oxytocin on GnRH neurons. *J. Neuroendocrinol.* 19, 439–448. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2007.01550.x>.

Chu, H.P., Etgen, A.M., 1997. A potential role of cyclic GMP in the regulation of lordosis behavior of female rats. *Horm. Behav.* 32, 125–132. <https://doi.org/10.1006/hbeh.1997.1413>.

Chu, H.P., Morales, J.C., Etgen, A.M., 1999. Cyclic GMP may potentiate lordosis behaviour by progesterone receptor activation. *J. Neuroendocrinol.* 11, 107–113. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.1999.00298.x>.

Cipolla-Neto, J., do Amaral, F.G., 2018. Melatonin as a hormone: new physiological and clinical insights. *Endocr. Rev.* 39, 990–1028. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00084>.

Clasadonte, J., Foulain, P., Hanchate, N.K., Corfas, G., Ojeda, S.R., Prevot, V., 2011. Prostaglandin E₂ release from astrocytes triggers gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron firing via EP2 receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 16104–16109. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107533108>.

Coleman, R.A., Smith, W.L., Narumiya, S., 1994. International union of pharmacology classification of prostanoicid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol. Rev.* 46, 205–229.

Domínguez-Ordóñez, R., García-Juárez, M., Lima-Hernández, F.J., Gómora-Arrati, P., Blaustein, J.D., Etgen, A.M., González-Flores, O., 2016. Estrogen receptor α and β are involved in the activation of lordosis behavior in estradiol-primed rats. *Horm. Behav.* 86, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.08.010>.

Domínguez-Ordóñez, R., García-Juárez, M., Lima-Hernández, F.J., Gómora-Arrati, P., Blaustein, J.D., González-Flores, O., 2015. Sexual receptivity facilitated by unsterilized estradiol: dependence on estrogen and progesterone receptors and priming dose of estradiol benzoate. *Behav. Neurosci.* 129, 777–788. <https://doi.org/10.1037/bne0000103>.

Domínguez-Ordóñez, R., García-Juárez, M., Lima-Hernández, F.J., Gómora-Arrati, P., Domínguez-Salazar, E., Blaustein, J.D., Etgen, A.M., González-Flores, O., 2018. Lordosis facilitated by GPER-1 receptor activation involves GnRH-1, progesterone and estrogen receptors in estrogen-primed rats. *Horm. Behav.* 98, 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2017.12.005>.

Eckersell, C.B., Popper, P., Micevych, P.E., 1998. Estrogen-induced alteration of μ -opioid receptor immunoreactivity in the medial preoptic nucleus and medial amygdala. *J. Neurosci.* 18, 3967–3976. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-10-03967.1998>.

Etgen, A.M., Acosta-Martínez, M., 2003. Participation of growth factor signal transduction pathways in estradiol-facilitation of female reproductive behavior. *Endocrinology* 144, 3828–3835. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0157>.

Fiebig, B.L., Schleicher, S., Spleiss, C., Czzyan, M., Hübl, M., 2001. Mechanisms of prostaglandin E₂-induced interleukin-6 release in astrocytes: possible involvement of EP4-like receptors, p38 mitogen-activated protein kinase and protein kinase C. *J. Neurochem.* 79, 950–958. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00652.x>.

Frye, C.A., Wolf, A.A., 2010. Oxytocin and/or steroid hormone binding globulin infused into the ventral tegmental area modulates progesterone-mediated lordosis. *Neuropharmacology* 58, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.07.006>.

Fujita, Y., Yamashita, T., 2019. The effects of leptin on glial cells in neurological diseases. *Front. Neurosci.* 13, 828. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00828>.

García-Juárez, M., Beyer, C., Soto-Sánchez, A., Domínguez-Ordóñez, R., Gómora-Arrati, P., Lima-Hernández, F.J., Eguibar, J.R., Etgen, A.M., González-Flores, O., 2011. Leptin facilitates lordosis behavior through GnRH-1 and progesterone receptors in estrogen-primed rats. *Neuropeptides* 45, 63–67. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2010.11.001>.

García-Juárez, M., Beyer, C., Gómora-Arrati, P., Lima-Hernández, F.J., Domínguez-Ordóñez, R., Eguibar, J.R., Etgen, A.M., González-Flores, O., 2012. The nitric oxide pathway participates in lordosis behavior induced by central administration of leptin. *Neuropeptides* 46, 49–53. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2011.09.003>.

- García-Juárez, M., Beyer, C., Gómora-Arrati, P., Domínguez-Ordóñez, R., Lima-Hernández, F.J., Egubiar, 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. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.05.014>.
- García-Juárez, M., Montes-Narváez, O., Lima-Hernández, F.J., Domínguez-Ordóñez, R., Pfau, J.G., González-Flores, O., 2020. Tibolone facilitates lordosis behavior through estrogen, progesterin, and GnRH-1 receptors in estrogen-primed rats. *Neurosci. Lett.* 736, 135299. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135299>.
- García-Segura, L.M., McCarthy, M.M., 2004. Mini-review: role of glia in neuroendocrine function. *Endocrinology* 145, 1082–1086. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1383>.
- García-Segura, L.M., Melcangi, R.C., 2006. Steroids and glial cell function. *Glia* 54, 485–498. <https://doi.org/10.1002/glia.20404>.
- Gómora-Arrati, P., Beyer, C., Lima-Hernández, F.J., Gracia, M.E., Etgen, A.M., González-Flores, O., 2008. GnRH mediates estrous behavior induced by ring a reduced progesterin and vaginal stimulation. *Behav. Brain Res.* 187, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.08.017>.
- Gómora-Arrati, P., González-Flores, O., Galicia-Aguas, Y.L., Hoffman, K.L., Komisaruk, B., 2019. Copulation-induced antinociception in female rats is blocked by atosiban, an oxytocin receptor antagonist. *Horm. Behav.* 107, 76–79. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.12.001>.
- González-Flores, O., Gómora-Arrati, P., García-Juárez, M., Gómez-Camarillo, M.A., Lima-Hernández, F.J., Beyer, C., Etgen, A.M., 2009. Nitric oxide and ERK/MAPK mediation of estrous behavior induced by GnRH, PGE2 and db-cAMP in rats. *Physiol. Behav.* 96, 606–612. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.12.019>.
- González-Flores, O., Ramírez-Ordóñez, J.M., Lima-Hernández, F.J., García-Juárez, M., 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. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.08.011>.
- Gorzalka, B.B., Lester, G.L.L., 1987. Oxytocin-induced facilitation of lordosis behaviour in rats is progesterone-dependent. *Neuropeptides* 10, 55–65. [https://doi.org/10.1016/0143-4179\(87\)90089-8](https://doi.org/10.1016/0143-4179(87)90089-8).
- Hardy, D.F., DeBold, J.F., 1971. The relationship between levels of exogenous hormones and the display of lordosis by the female rat. *Horm. Behav.* 2, 287–297. [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(71\)90003-1](https://doi.org/10.1016/0018-506X(71)90003-1).
- Heaulme, M., Dray, F., 1984. Noradrenaline and prostaglandin E2 stimulate LH-RH release from rat median eminence through distinct 1-alpha-adrenergic and PGE2 receptors. *Neuroendocrinology* 39, 403–407. <https://doi.org/10.1159/000124012>.
- Hoshino, T., Namba, T., Takekura, M., Murao, N., Matsushima, T., Sugimoto, Y., Narumiyu, S., Suzuki, T., Mizushima, T., 2012. Improvement of cognitive function in Alzheimer's disease model mice by genetic and pharmacological inhibition of the EP4 receptor. *J. Neurochem.* 120, 795–805. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07567.x>.
- Hristovska, A.M., Rasmussen, L.E., Hansen, P.B.L., Nielsen, S.S., Nising, R.M., Narumiyu, S., Vanhouste, P., Skott, O., Jensen, B.L., 2007. Prostaglandin E2 induces vascular relaxation by E-prostanoid 4 receptor-mediated activation of endothelial nitric oxide synthase. *Hypertension* 50, 525–530. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.088948>.
- Ivarsson, A., Andersen, M., Johnson, U., Lindwall, M., 2013. To adjust or not adjust: nonparametric effect sizes, confidence intervals, and real-world meaning. *Psychol. Sport. Exercise* 14, 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.psychsport.2012.07.007>.
- Jurek, B., Neumann, I.D., 2018. The oxytocin receptor: from intracellular signaling to behavior. *Physiol. Rev.* 98, 1805–1908. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2017>.
- Katoh, H., Watabe, A., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Negishi, M., 1995. Characterization of the signal transduction of prostaglandin E receptor EP1 subtype in cDNA-transfected chinese hamster ovary cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1244, 41–48. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(94\)00182-W](https://doi.org/10.1016/0304-4165(94)00182-W).
- Kauffman, A.S., Rissman, E.F., 2004. A critical role for the evolutionarily conserved gonadotropin-releasing hormone II: mediation of energy status and female sexual behavior. *Endocrinology* 145, 3639–3646. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0148>.
- 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, 12354–12357. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404889101>.
- Lenhard, W., Lenhard, A., 2016. Calculation of Effect Sizes. *Psychometrica*, Dettelbach (Germany). <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.17823.92329>. Retrieved from: https://www.psychometrica.de/effect_size.html.
- 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 progesterins, GnRH, prostaglandin E2 and vaginal stimulation in estrogen-primed rats. *Horm. Behav.* 62, 579–584. <https://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 progesterins, peptides, and prostaglandin E2. *Horm. Behav.* 66, 361–368. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.06.011>.
- Mani, S.K., Blaustein, J.D., 2012. Neural progesterin receptors and female sexual behavior. *Neuroendocrinology* 96, 152–161. <https://doi.org/10.1159/000338668>.
- Mani, S.K., Fienberg, A.A., O'Callaghan, J.P., Snyder, G.L., Allen, P.B., Dash, P.K., Moore, A.M., Mitchell, A.J., Bibb, J., Greengard, P., O'Malley, B.W., 2000. Requirement for DARPP-32 in progesterone facilitated sexual receptivity in female rats and mice. *Science* 287, 1053–1056. <https://doi.org/10.1126/science.287.5455.1053>.
- Melis, M.R., Argüolas, A., 1995. Dopamine and sexual behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 19, 9–38. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(94\)00020-2](https://doi.org/10.1016/0149-7634(94)00020-2).
- McCarthy, M.M., Kleopoulos, S.F., Mobbs, C.V., Pfaff, D.W., 1994. Infusion of antisense oligodeoxynucleotides to the oxytocin receptor in the ventromedial hypothalamus reduces estrogen-induced sexual receptivity and oxytocin receptor binding in the female rat. *Neuroendocrinology* 59, 432–440. <https://doi.org/10.1159/000126689>.
- McEwen, B.S., Jones, K.J., Pfaff, D.W., 1987. Hormonal control of sexual behavior in the female rat: molecular, cellular and neurochemical studies. *Biol. Reprod.* 36, 37–45. <https://doi.org/10.1095/biolreprod36.1.37>.
- Melcangi, R.C., Magnaghi, V., Galbiati, M., Martini, L., 2001. Glial cells: a target for steroid hormones. *Prog. Brain Res.* 132, 31–40. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(01\)32063-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(01)32063-0).
- Micewych, P., Sinchak, K., 2007. The neurochemistry of limbic-hypothalamic circuits regulating sexual receptivity. In: Blaustein, J.D. (Ed.), *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Behavioral Neurochemistry, Neuroendocrinology and Molecular Neurobiology*. Springer, Boston, MA, pp. 151–193. https://doi.org/10.1007/978-0-387-30405-2_4.
- Miller, F.D., Ozimek, G., Milner, R.J., Bloom, F.E., 1989. Regulation of neuronal oxytocin mRNA by ovarian steroids in the mature and developing hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 2468–2472. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.7.2468>.
- Mohácsik, P., Zeöld, A., Bianco, A.C., Gereben, B., 2011. Thyroid hormone and the neoglia: both source and target. *J. Thyroid Res.* 2011, 215718. <https://doi.org/10.4061/2011/215718>.
- Moss, R.L., McCann, S.M., 1973. Induction of mating behavior in rats by luteinizing hormone-releasing factor. *Science* 181, 177–179. <https://doi.org/10.1126/science.181.4095.177>.
- Nakada, T., 2021. Efficacy of the delayed use of low-dose aspirin in intravenous immunoglobulin therapy for acute-phase Kawasaki disease. *Eur. J. Med. Health. Sci.* 3, 121–126. <https://doi.org/10.24018/ejmed.2021.3.1.691>.
- Nyuyki, K.D., Waldherr, M., Baesuml, S., Neumann, I.D., 2011. Yes, I am ready now: differential effects of paced versus unpaced mating on anxiety and central oxytocin release in female rats. *PloS. One* 6, 23599. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023599>.
- Ohinata, K., Suetsugu, K., Fujiwara, Y., Yoshikawa, M., 2006. Activation of prostaglandin E receptor EP4 subtype suppresses food intake in mice. *Prostaglandins. Other. Lipid. Mediat.* 81, 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2006.06.008>.
- Ojeda, S.R., Jameson, H.E., McCann, S.M., 1977a. Hypothalamic areas involved in prostaglandin(PG)-induced gonadotropin release. I. effects of PGE2 and PGF2 α implants on luteinizing hormone release. *Endocrinology* 100, 1585–1594. <https://doi.org/10.1210/endo-100-6-1585>.
- Ojeda, S.R., Jameson, H.E., McCann, S.M., 1977b. Hypothalamic areas involved in prostaglandin(PG)-induced gonadotropin release. II. effects of PGE2 and PGF2 α implants on follicle stimulating hormone release. *Endocrinology* 100, 1595–1603. <https://doi.org/10.1210/endo-100-6-1595>.
- Ojeda, S.R., Negro-Vilar, A., 1985. Prostaglandin E2-induced luteinizing hormone-releasing hormone release involves mobilization of intracellular Ca²⁺. *Endocrinology* 116, 1763–1770. <https://doi.org/10.1210/endo-116-5-1763>.
- Ojeda, S.R., Negro-Vilar, A., McCann, S.M., 1982. Evidence for involvement of α -adrenergic receptors in norepinephrine-induced prostaglandin E and luteinizing hormone-releasing hormone release from the median eminence. *Endocrinology* 110, 409–412. <https://doi.org/10.1210/endo-110-2-409>.
- Ojeda, S.R., Negro-Vilar, A., McCann, S.M., 1979. Release of prostaglandins by hypothalamic tissue: evidence for their involvement in catecholamine-induced luteinizing hormone-releasing hormone release. *Endocrinology* 104, 617–624. <https://doi.org/10.1210/endo-104-3-617>.
- Ojeda, S.R., Hams, P.G., McCann, S.M., 1975. Effect of inhibitors of prostaglandin synthesis on gonadotropin release in the rat. *Endocrinology* 97, 843–854. <https://doi.org/10.1210/endo-97-4-843>.
- Parent, A.S., Rasier, G., Matagne, V., Lomniczi, A., Lebrethon, M.C., Gérard, A., Ojeda, S.R., Bourguignon, J.P., 2008. Oxytocin facilitates female sexual maturation through a glia-to-neuron signaling pathway. *Endocrinology* 149, 1358–1365. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1054>.
- Paxinos, G., Watson, C., 2006. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, Australia.
- Pedersen, C.A., Boccia, M.L., 2002. Oxytocin maintains as well as initiates female sexual behavior: effects of a highly selective oxytocin antagonist. *Horm. Behav.* 41, 170–177. <https://doi.org/10.1006/hbeh.2001.1736>.
- Petersen, S.L., McCrone, S., Keller, M., Shores, S., 1995. Effects of estrogen and progesterone on luteinizing hormone-releasing hormone messenger ribonucleic acid levels: consideration of temporal and neuroanatomical variables. *Endocrinology* 136, 3604–3610. <https://doi.org/10.1210/endo.136.8.7628399>.
- Petersen, S.L., McCrone, S., Shores, S., 1993. Localized changes in LHRH mRNA levels as cellular correlates of the positive feedback effects of estrogen on LHRH. *Neurosci. Am. Zool.* 33, 255–265. <https://doi.org/10.1093/cbz/33.2.255>.
- Pfau, J.G., Jones, S.L., Flanagan-Cato, L.M., Blaustein, J.D., 2015. Female sexual behavior. In: Plant, T., Zeleznik, A. (Eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Two-volume Set*. Elsevier, pp. 2287–2370. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00050-8>.
- Quiñones-Jenab, V., Jenab, S., Ogawa, S., Adan, R.A.M., Burbach, J.P.H., Pfaff, D.W., 1997a. Effects of estrogen on oxytocin receptor messenger ribonucleic acid expression in the uterus, pituitary, and forebrain of the female rat. *Neuroendocrinology* 65, 9–17. <https://doi.org/10.1159/00012716>.
- Quiñones-Jenab, V., Jenab, S., Ogawa, S., Inturrisi, C., Pfaff, D.W., 1997b. Estrogen regulation of μ -opioid receptor mRNA in the forebrain of female rats. *Mol. Brain Res.* 47, 134–138.
- Ramírez-Ordóñez, 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. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.12.022>.
- Rodríguez-Sierra, J.F., Komisaruk, B.R., 1977. Effects of prostaglandin E2 and indomethacin on sexual behavior in the female rat. *Horm. Behav.* 9, 281–289. [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(77\)90063-0](https://doi.org/10.1016/0018-506X(77)90063-0).
- Schulze, H.G., Gorzalka, B.B., 1991. Oxytocin effects on lordosis frequency and lordosis duration following infusion into the medial pre-optic area and ventromedial hypothalamus of female rats. *Neuropeptides* 18, 99–106. [https://doi.org/10.1016/0143-4179\(91\)90008-7](https://doi.org/10.1016/0143-4179(91)90008-7).
- Schumacher, M., Coirini, H., Flanagan, L.M., Frankfurt, M., Pfaff, D.W., McEwen, B.S., 1992. Ovarian steroid modulation of oxytocin receptor binding in the ventromedial hypothalamus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 652, 374–386. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb34368.x>.
- Schumacher, M., Coirini, H., Frankfurt, M., McEwen, B.S., 1989. Localized actions of progesterone in hypothalamus involve oxytocin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 6798–6801. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.17.6798>.
- Schumacher, M., Coirini, H., Pfaff, D.W., McEwen, B.S., 1990. Behavioral effects of progesterone associated with rapid modulation of oxytocin receptors. *Science* 250, 691–694. <https://doi.org/10.1126/science.2173139>.
- Siegel, S., Castellan, N.J., 1995. *Estadística no paramétrica, aplicada a las ciencias de la conducta*, 4a. edición. Editorial Trillas, México.
- Sugimoto, Y., Narumiya, S., 2007. Prostaglandin E receptors. *J. Biol. Chem.* 282, 11613–11617. <https://doi.org/10.1074/jbc.R600038200>.
- Tasker, J.G., Oliet, S.H.R., Bains, J.S., Brown, C.H., Stern, J.E., 2012. Glial regulation of neuronal function: from synapse to systems physiology. *J. Neuroendocrinol.* 24, 566–576. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02259.x>.
- Witt, D.M., Insel, T.R., 1991. A selective oxytocin antagonist attenuates progesterone facilitation of female sexual behavior. *Endocrinology* 128, 3269–3276. <https://doi.org/10.1210/endo-128-6-3269>.
- Xu, S., Zhang, Z., Ogawa, O., Yoshikawa, T., Sakamoto, H., Shibasaki, N., Goto, T., Wang, L., Terada, N., 2014. An EP4 antagonist ONO-AE3-208 suppresses cell invasion, migration, and metastasis of prostate cancer. *Cell Biochem. Biophys.* 70, 521–527. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-9951-2>.
- Young, L.J., Wang, Z., Donaldson, R., Rissman, E.F., 1998. Estrogen receptor α is essential for induction of oxytocin receptor by estrogen. *Neuroreport* 9, 933–936. <https://doi.org/10.1097/00001756-199803300-00031>.
- Young, L.J., Muns, S., Wang, Z., Insel, T.R., 2003. Changes in oxytocin receptor mRNA in rat brain during pregnancy and the effects of estrogen and Interleukin-6. *J. Neuroendocrinol.* 9, 859–865. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.1997.00654.x>.
- Zhang, Y., Daaka, Y., 2011. PGE2 promotes angiogenesis through EP4 and PKA γ pathway. *Blood* 118, 5355–5364. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-350587>.
- Zhouab, L., Hammer, R.P., 1995. Gonadal steroid hormones upregulate medial preoptic μ -opioid receptors in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 278, 271–274. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(95\)00175-K](https://doi.org/10.1016/0014-2999(95)00175-K).

