



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

Participación del Receptor a
Progesterona en el Control
Neuroendócrino de la Conducta del Estro
Postparto en la Rata

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR(A) EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Graciela Elena Carrillo Martínez

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Doctor Ignacio Camacho Arroyo

**COMITÉ TUTOR: Doctor Marco Antonio Cerbón Cervantes
Doctor Gabriel Roldán Roldán**

MÉXICO, D.F.

Agosto, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/349/11

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **11 de abril de 2011**, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** del (la) alumno (a) **CARRILLO MARTÍNEZ GRACIELA ELENA** con número de cuenta **96503928** con la tesis titulada: **"Participación del Receptor a Progesterona en el Control Neuroendócrino de la Conducta del Estro Postparto en la Rata"**, realizada bajo la dirección del (la) **DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO:**

Presidente:	DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALÁ
Vocal:	DRA. MARÍA GENOVEVA GONZÁLEZ MORÁN
Secretario:	DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES
Suplente:	DRA. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN
Suplente	DR. GABRIEL ROLDÁN ROLDÁN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 20 de junio de 2011.

M. del Coro Arizmendi
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa



MCAA/MJFM/ASR/ipp

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por brindarme el entorno ideal para llevar a cabo este paso tan importante en mi formación.

Al CONACYT, por el apoyo económico que me permitió llevar a cabo la investigación que es el origen de esta tesis, mediante la beca para alumnos de Doctorado con número de registro: 202556, CVU 205332.

A los miembros del comité Tutor: Dr. Ignacio Camacho Arroyo, Dr Marco Antonio Cerbón Cervantes y Dr. Gabriel Roldán Roldán por su atenta y dedicada guía durante toda esta etapa, brindándome su experiencia, sus conocimientos, sus consejos y su ejemplo con gran generosidad.

Gracias al Jurado:

Dr. Roberto Domínguez Casalá
Dra. María Genoveva González Morán
Dr. Marco Antonio Cerbón
Dra. María Esther Cruz Beltrán
Dr. Gabriel Roldán Roldán

Por dedicar parte de su tiempo a revisar y comentar mi trabajo con
atención y amabilidad.

Agradecimientos a Título Personal

Tengo mucho que agradecer a un gran número de personas. Apenas puedo expresar el aprecio y reconocimiento por su apoyo:

Al Dr. Ignacio Camacho Arroyo, quien creyó en mí, me impulsó, me otorgó inagotable paciencia, valiosos conocimientos y el caudal de sabiduría que posee aún cuando es un investigador muy joven. Gracias Nacho por ser un gran científico, un ejemplo a seguir y un gran líder para tu grupo de trabajo, pero también por que contagias con tu entusiasmo y tu alegría de vivir. Eres una gran persona y me siento honrada por haberte conocido, siempre tendré como motivo de orgullo el haber sido tu alumna y que tú seas mi mentor. No es necesario decir que siento por ti una gran admiración y un muy especial afecto.

Al Dr. Marco Cerbón, que siempre fue generoso con sus conocimientos, sus ideas y la brillante actividad de sus pensamientos, además de ser siempre gentil y amable en todas las interacciones que tuvimos como Tutor-Alumna y como vecinos de laboratorio. Es admirable su amor por la ciencia.

Al Dr. Gabriel Roldán, quién no sólo fungió como miembro del comité tutorial, sino que también me brindó la gran oportunidad de realizar este sueño al formar parte de la comisión que aprobó mi cambio de tutor y proyecto; su dedicación a la formación de alumnos es ejemplar y le agradezco sus valiosos comentarios y consejos que finalmente, fueron determinantes para dar forma a la parte del proyecto de investigación de la que se ocupa esta tesis.

A todo el personal del CIRA Panotla: Al Dr. Oscar González Flores que me otorgó su confianza al incluirme en el marco de su investigación y que me ayudó con tantas explicaciones, me permitió hacer uso de sus instalaciones, material biológico, recursos, referencias, etc; al Dr. Porfirio Gómora Arrati científico dedicado y persona de gran valía, por su hospitalidad, conocimientos, alimentos, horas de desvelo, bibliografía y amistad; a su esposa, Bióloga Guadalupe Domínguez, Lupita, mujer ejemplar quien no sólo brindó apoyo técnico sino que me hizo sentir como parte de su familia. Te admiro por tu gran fuerza, valentía y alegría, tengo por ti un gran cariño.

Al Dr. Carlos Beyer por su inapreciable gentileza, no tengo palabras suficientes para expresar lo muy honrada que me siento por la atención que le brindó a mi trabajo.

A todo el personal del laboratorio 107 de la Facultad de Química, compañeros y amigos que me acogieron y brindaron conocimientos, ayuda y buenos momentos:

A Tere Neri quien me introdujo en las técnicas del laboratorio y fomentó mi gusto por la música de Keane;

A Edith Cabrera, mujer bella por dentro y por fuera, con gran dedicación a la Ciencia, fortaleza e inteligencia; eres admirable en el terreno académico y sé que serás brillante como mamá.

A Judith Espinosa, porque su estancia postdoctoral me permitió conocer a una persona encantadora y una de mis más entrañables amigas.

A Tania Hernández, un gran ejemplo de tenacidad, responsabilidad y dulzura; a Tania “Petite”, siempre llena de energía y alegría.

A Jenny, con quien pude compartir el gusto por la conducta animal y por “comadrear” de computadora a computadora.

A Valeria Hansberg, por compartir desde los momentos de comida hasta el zumba y la amistad.

A Miguel Peña, por el chisme, los links, las risas y los deliciosos platillos. Felicitaciones por ser el “blot master” y muy pronto un gran QFB.

A Gaby Piña, estudiante dedicada, amiga dulce y persona preciosa, que hace que cada momento cerca de ella esté lleno de luz.

A Alejandro Cabrera profesor de bioquímica y compañero, sin duda tendrás éxito en tus dos proyectos: el postdoctorado y el nuevo bebé,

A Liliana, que día a día y con dedicación se entrega al trabajo del laboratorio, pero jamás se olvida de alegrarlo con su chispa.

A Michelle, brillante estudiante de primer semestre de Biología, quien me brindó un valioso apoyo durante su estancia mientras estudiaba el bachillerato, te deseo éxito en tu nueva etapa con mucho cariño.

A Irene, quien con gran dulzura brinda su valiosísima ayuda.

A Aliesha, muy especialmente, ya que sin ti no habría sido posible llevar a cabo este proyecto. Eres una persona maravillosa, mujer e investigadora admirable y plena, fuente de inspiración para las mujeres que queremos hacer Ciencia y una gran amiga. Gracias x 10^{∞} .

A Sofí, Erika, Gaby, Milena, Joshua, Pera, Karla, Caro, Galileo, Marco, Brenda, Diana, Aglaé, Cynthia, Geno, compañeros que en el tiempo que compartimos en el laboratorio contribuyeron a brindarme la certeza de que, finalmente, llegué al mejor grupo de investigación, en todos los sentidos.

A Rita Arenas, por iniciarme en la senda del estudio de la conducta animal.

A Lilián Mayagoitia por iniciarme en el estudio de las hormonas y la conducta.

A Ana Lilia cerda, por ser amiga e inspiración así como ejemplo de la dedicación y entusiasmo que debe mostrar un estudiante de Doctorado.

A quienes me orientaron y apoyaron en el cambio de Tutor y Proyecto: Enrique Moreno, Genoveva González, Ana María Santillán.

Y a título aún más personal:

A mis padres, por su apoyo, su cariño y esfuerzo, por darlo todo por sus hijos.

A mi tía Tere quien me inculcó el valor del conocimiento y que me brindó todo su apoyo para lograr este sueño,

A mi abuelita Hellen, quien entre otras muchas cosas que le debo, está el haber insistido siempre que aprendiera bien el idioma Inglés. Nada se puede hacer en Ciencia actualmente sin manejar ese idioma. Te quiero.

A mis hermanos:

Agustín, que cada día es una mejor persona y hoy es un orgullo para su familia.

Betty, artista valiente que persigue sus sueños.

Tere, siempre tierna y a la vez con la fuerza para vencer cualquier obstáculo. Es una gran alegría verlos como adultos libres y cada día más felices. Gracias por apoyarme y quererme. Los amo.

A mi tía y madrina María Victoria, fuente de inspiración como mujer profesionalista, fuerte e inteligente, capaz de lograr cualquier cosa. Y a sus hijas:

A mis primas Vale y Jenny por todos los momentos compartidos, son las mejores vecinas que podía haber soñado. Las tres ocupan un lugar muy especial en mi corazón.

A mi tía Patty, llena de fuerza y alegría de vivir.

A mi tía Consuelo, porque sé que donde estás compartirás la alegría de este logro. Me enseñaste cosas invaluable.

A mi abuelita Conchita, madre de una gran familia y mujer profesionalista.

Gracias a toda mi familia, sin quienes no sería quien soy ahora.

A mi amiga Karlena, nos perdimos un tiempo, pero nos encontramos y ha sido como siempre y me parece que eso prueba qué tan profunda y verdadera es nuestra amistad.

A mi amiga Melody, que aunque estés lejos, siempre te siento cerca de mí.

A toda la Factoría Escénica que me brindó alegría, equilibrio, momentos inolvidables y la posibilidad de mantener mi a-normalidad: Beto, Yoaly, Ivonne, Ossiell, Janet, Tere, Alejandra, Ramón-Sobre-, Conse, Trixa, Mauricio y especialmente:

A mi amiga Judy, con el ferviente deseo de que obtengas el éxito en tu posgrado y seas feliz, ya que las dos cosas son compatibles, como he podido constatar.

A mis amigos Víctor, Anabel y Jose Luis porque me dieron gran impulso y alegría en estos años y estoy segura de que ni siquiera se dieron cuenta.

Y a Marco Antonio Santiago como Director de la Factoría con enorme admiración, por darnos un taller de Teatro para científicos y así abrirnos la puerta a increíbles experiencias de vida.

A las hermanas Miroslava y Gela Cauich, porque son lo máximo.

Y también:

A Osama (donde estés) y Mota porque me han permitido el privilegio de estar cerca de su belleza y gracia.

A Pumbi, mi compañero en prácticas de campo y congresos, esta tesis también es tuya.

Y a título aún mas personal

A Marco –Dragón- Mijares por millones de cosas, pero para mencionar sólo la primera (porque si no hago así el agradecimiento tendría la longitud de la tesis) por las charlas sin voz –y las charlas con voz- hasta el alba.

Y a título todavía más personal:

A Marco Antonio Santiago

Por ser mi fuerza, mi compañero, el amor de mi vida, mi mayor apoyo, por creer en mí, por sostenerme en los momentos difíciles, por la comprensión, las charlas, el café, la lluvia, el hospedaje, las películas, los sueños. Por ser mi pareja, mi mejor amigo, mi director de teatro, el master de rol, la persona que más me hace reír. Te amo.

A Dios, Creador de los esteroides y el RP, entre muchas cosas geniales, pero especialmente por haber tenido la brillantísima idea de la reproducción sexual.

Dedicatoria

A Marco Antonio Santiago con todo mi amor.

"...buscar y saber reconocer quién y qué, en medio del infierno, no es infierno, y hacer que dure, y dejarle espacio" -Italo Calvino, Las Ciudades Invisibles-

"Un peu de Science éloigne de Dieu, mais beaucoup y ramène."

- Louis Pasteur -

"Cuando se es muy joven y se sabe un poco, las montañas son montañas, el agua es agua y los árboles son árboles. Cuando se ha estudiado y se es leído, las montañas ya no son montañas, el agua ya no es agua y los árboles ya no son árboles. Cuando se es sabio, nuevamente las montañas son montañas, el agua es agua y los árboles son árboles."

- Antigua Refrán del Budismo Zen -

Participación del Receptor a Progesterona en La Conducta de Estro Postparto en
la Rata.

Índice

Resumen.....	4
Abstract.....	6
1.Introducción.....	8
2.Antecedentes.....	8
2.1 Ciclo estral.....	8
2.2 Conducta sexual en la rata hembra.....	11
2.3 Modulación neuroendócrina de la conducta sexual.....	11
2.3.1 Reflejo de lordosis.....	11
2.3.2 Hipotálamo.....	15
2.3.3 Hormonas y neurotransmisores que regulan la conducta sexual en la rata hembra.....	18
2.4 Receptores Intracelulares a Progesterona (RP).....	24
2.4.1 Estructura.....	25
2.4.2 Isoformas del RP.....	27
2.4.3 Mecanismo de acción del RP.....	31
2.5 Estro Postparto.....	35
3. Planteamiento del Problema.....	38
4. Hipótesis.....	38
5. Objetivos.....	38
6. Materiales y métodos.....	39
6.1 Animales.....	39
6.2 Pruebas conductuales.....	39
6.3 Extracción de los tejidos.....	40
6.4 Radioinmunoensayo.....	41
6.5 Extracción de Proteínas.....	41
6.6 Western Blot.....	42
6.7 Análisis densitométrico y estadístico.....	43

7. Resultados.....	44
7.1 Experimento 1. Análisis del comportamiento sexual de la hembra durante el postparto.....	44
7.2. Experimento 2. Radioinmunoensayo para estradiol y progesterona.....	45
7.3. Experimento 3. Efecto del RU 486 en el despliegue de la conducta de estro postparto.....	46
7.4. Experimento 4. Detección de las isoformas de RP durante el periodo postparto mediante Western Blot.....	49
7.5 Experimento 5. Efecto de la administración de RU 486 en el contenido de las isoformas de RP en hipotálamo y área preóptica durante el período postparto.....	53
8. Discusión.....	56
9. Conclusiones.....	62
10. Bibliografía.....	63

Anexo: artículos

- I. Carrillo-Martínez, G.E., Gómora-Arrati, P., González-Arenas, A., Morimoto, S., Camacho-Arroyo, I., González-Flores, O. 2011 Role of progesterone receptors during postpartum estrus in rats. *Hormones and Behavior* 59: 37–43.
- II. Carrillo-Martínez, G.E., Gómora-Arrati, P., González-Arenas, A., Roldán-Roldán, G., González-Flores, O., Camacho-Arroyo, I. Effects of RU486 in the Expression of PR Isoforms in the Rat Brain During Postpartum Estrus (en prensa).

Lista de figuras y tablas.

Fig. 1. Etapas del ciclo estral de la rata y niveles de Estradiol y Progesterona.....	9
Fig.2. Circuito neural involucrado en el despliegue de la lordosis.....	14
Fig. 3. Estructura del RP de la rata.....	26
Fig.4. Regulación de la expresión génica por progesterona a través del receptor intracelular.....	33
Fig.5. Cambios en el LQ y el porcentaje de hembras proceptivas durante el primer día postparto en ratas.....	45

Fig.6. Niveles de estradiol y progesterona en suero durante el primer día postparto.....	46
Fig. 7. Efectos de RU486 en la conducta de estro durante el período postparto en las ratas.....	48
Fig.8. Contenido de las isoformas de RP en el hipotálamo y área preóptica durante el período postparto.....	50
Fig.9. Análisis densitométrico del contenido de las isoformas de RP en el hipotálamo y área preóptica durante el período postparto	51
Fig. 10. Cambios en la proporción de RPB/RPA durante el período postparto ...	52
Fig.11.Efecto de la administración de RU486 en el contenido de las isoformas de RP en el hipotálamo	54
Fig.12.Efecto de la administración de RU486 en el contenido de las isoformas de RP en el área preóptica.....	55

“Participación del Receptor a Progesterona en el Control Neuroendócrino de la Conducta del Estro Postparto en la Rata”

Resumen

En los mamíferos, la conducta sexual de la hembra es regulada a nivel del sistema nervioso central (SNC) por una compleja red de señalizaciones químicas, que incluyen neurotransmisores y hormonas, principalmente, el estradiol (E) y la progesterona (P). Dichas hormonas tienen una función determinante en la expresión de la conducta sexual de la rata hembra y su acción en el cerebro se lleva a cabo principalmente por su unión a sus receptores nucleares. En algunos mamíferos, se presenta un fenómeno conocido como estro postparto, un breve período en que se presenta la ovulación acompañada de receptividad sexual, el cual ocurre en la rata durante las primeras 24 horas después del parto. La máxima expresión de la lordosis se presenta a las 9 y 12 h tras el parto y termina alrededor de las 21 h postparto. Si la hembra no concibe en este período se inicia un período de diestro prolongado debido a la lactancia. Si la hembra concibe, el apareamiento postparto producirá la gestación y lactancia de dos camadas simultáneas. En roedores la conducta de estro es inducida por la acción secuencial de E y P. El E estimula los sustratos neurales que regulan la lordosis y la P favorece el inicio e incrementa la intensidad de esta conducta. Los efectos de P en la conducta sexual se efectúan a través de su receptor intracelular (el receptor a P, RP) localizado en neuronas del núcleo ventromedial y el área preóptica media del hipotálamo. En la rata, el RP se presenta como dos isoformas: RP-A de 86 kDa y RP-B de 110 kDa. Las isoformas del RP difieren en su capacidad para activar genes blanco en la misma célula. No existen estudios previos acerca de la regulación neuroendócrina del estro postparto. Por lo anterior, en este trabajo se estudió el papel del RP en el despliegue de la conducta sexual de la rata hembra durante el estro postparto. Se trataron ratas hembras adultas con el antagonista para el RP, RU486 (1.25 y 5 mg) 3 horas después del parto y se evaluó la conducta sexual durante todo el primer día del postparto. Los niveles de E y P cambiaron durante las primeras 24

horas postparto. Los niveles más elevados de E y P se encontraron a las 9 y 12 horas, respectivamente. La isoforma predominante del RP en el hipotálamo y el área preóptica durante el período postparto fue RP-A; el contenido de esta isoforma se incrementó a las 6 horas en el hipotálamo y el área preóptica, y disminuyó en ambas regiones a las 9 horas. El contenido de RP-B aumentó solamente en el área preóptica a las 12 horas. El mayor despliegue de lordosis y conductas proceptivas se encontró a las 12 horas postparto. El tratamiento con 1.25 y 5 mg de RU486 redujo la lordosis en 61% y 92% respectivamente. El tratamiento con RU486 también redujo la expresión de ambas isoformas del RP, pero sólo en el área preóptica. Este resultado nos conduce a sugerir que el RP es esencial en el despliegue del estro postparto en la rata.

Abstract

In female mammals, sexual behavior is regulated in the central nervous system by a complex chemical signaling network, especially by steroid hormones estradiol (E) and progesterone (P). These hormones have a critical function in the display of sexual behavior in female rats acting through their nuclear receptors. In several mammalian species, including rats (*Rattus norvegicus*) females undergo postpartum estrus, a brief period of ovulation and sexual receptivity that usually occurs in rats during the first 24 h following parturition. The maximal lordotic expression occurs at 9 and 12 h after the initiation of parturition and ended by 21 h postpartum. If a female rat fails to conceive during this period, a lactational diestrus begins, but if the female does conceive, postpartum mating will result in simultaneous gestation and lactation of two different litters. Estrus behavior in rodents is induced by the sequential action of E and P. E prepares the neural substrates for lordosis, and P triggers the onset and increases the intensity of this behavior. P effects on sexual behavior are mediated by its intracellular receptor (progesterone receptor, PR) located in the ventromedial nucleus in the hypothalamus and the medial preoptic area. In the rat, PR is expressed as two isoforms: PR-B, 110 kDa and PR-A, 86 kDa. PR isoforms differ in their ability to activate distinct target genes in the same cell. The neuroendocrine mechanisms involved in postpartum estrus behavior are unknown. We studied the role of PR in the display of female sexual behavior during postpartum estrus in rats. Adult female rats were treated with the PR antagonist, RU486 (1.25 and 5 mg), 3 h after parturition and sexual behavior was evaluated throughout the first postpartum day. E and P serum levels changed during the first 24 h postpartum. The highest E and P levels were found at 9 and 12 h postpartum, respectively. The predominant PR isoform in the hypothalamus and the preoptic area was PR-A during postpartum day. The content of PR-A increased at 6 h postpartum in the hypothalamus and the preoptic area, and decreased in both regions at 9 h. PR-B content only increased in the preoptic area at 12 h postpartum. The highest display of lordotic and proceptive behaviors were found at 12 h postpartum. The treatment with 1.25 and 5 mg of RU486 respectively reduced lordosis by 61% and 92% at 12 h postpartum.

RU486 treatment also reduced the content of both PR isoforms but only in the preoptic area. These results suggest that PR is essential in the display of postpartum estrus in rats.

1. Introducción

La conducta de estro en mamíferos indica que la hembra se encuentra fértil y receptiva hacia el macho. La receptividad se expresa principalmente mediante la conducta de lordosis que permite la penetración. Durante el ciclo estral, la rata presenta la máxima receptividad sexual después del aumento en la secreción de E, seguido del incremento de P. Varios estudios muestran que la conducta de lordosis está modulada mediante el receptor a P (RP), el cual se presenta en dos isoformas: RP-A (86-90 KDa) y RP-B (110-120 KDa). En varios mamíferos se presenta un fenómeno conocido como estro postparto, un breve período de receptividad sexual en las primeras 24 horas después del parto, acompañado de ovulación, lo que permite la fecundación y que la hembra pueda gestar una nueva camada mientras cuida y amamanta a la otra. No se conocen los mecanismos neuroendócrinos que regulan la transición de la nula actividad sexual de la hembra durante el embarazo hacia un intenso estro postparto.

2. Antecedentes

2.1 Ciclo estral

En varias especies de mamíferos la ovulación es cíclica y la conducta sexual se presenta durante el período periovulatorio. A este tipo de ciclo ovárico se le conoce como ciclo estral. El ciclo estral se divide en cuatro etapas: proestro, estro, metaestro y diestro. La rata (*Ratus norvegicus*) es un mamífero no estacional, de ovulación cíclica y poliéstrica. Durante el ciclo estral se presentan cambios estructurales en tejido reproductivo y variaciones en las concentraciones plasmáticas de hormonas. Mediante un frotis vaginal es posible identificar las diferentes etapas del ciclo estral de la rata, el cual tiene una duración de 4 a 5 días. (Fig 1). Las etapas del ciclo estral pueden distinguirse mediante el tipo de células que aparecen en el frotis vaginal: el proestro se caracteriza por el predominio de células epiteliales nucleadas, redondas y agrupadas,

ocasionalmente pueden aparecer células escamosas cornificadas; durante el estro la mayoría de las células son epiteliales escamosas, cornificadas, sin núcleo, con citoplasma altamente granular y de forma irregular; durante el metaestro y el diestro predominan los leucocitos, así como algunas células epiteliales nucleadas (Everett, 1989).

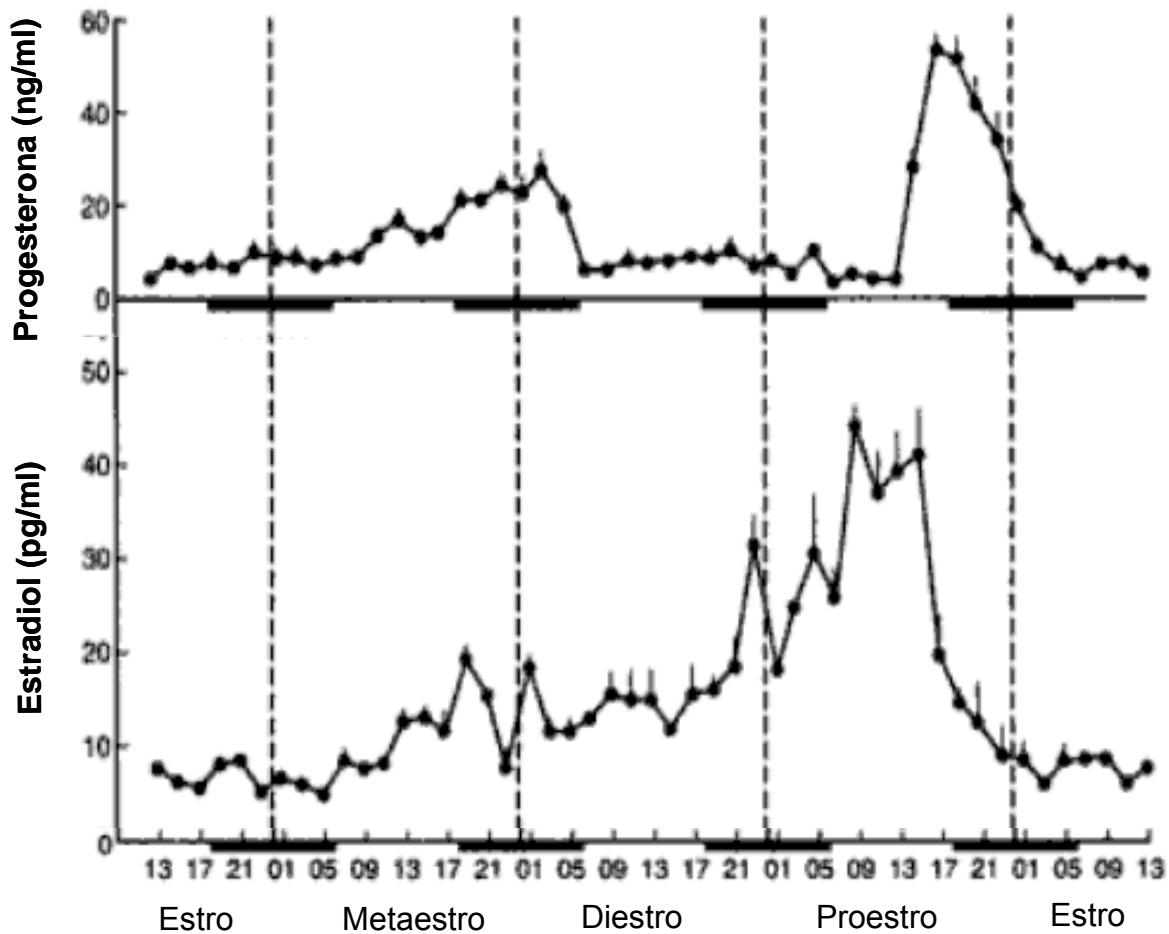


Fig. 1. Etapas del ciclo estral de la rata y niveles de E y P durante el ciclo (tomado de Freeman, 1988).

Los cambios en los tejidos reproductivos durante el ciclo ovárico se encuentran bajo control endócrino y siguen un ritmo circadiano. En un ciclo luz:oscuridad

natural, la hipófisis secreta niveles bajos de Hormona Luteinizante (LH) desde la noche del estro hasta la mañana del proestro. En la tarde del proestro, entre las 14 y 15 horas, los niveles circulantes de LH se incrementan rápidamente, para alcanzar el nivel máximo entre las 17 y 19 horas de ese mismo día. Este incremento en LH induce la ruptura del folículo y la ovulación. Estos niveles declinan para alcanzar valores basales en la mañana del día del estro. El patrón de secreción de la hormona folículo estimulante (FSH), es similar al de la LH, con secreción de niveles basales desde el metaestro a la tarde del proestro; a partir de las 14 ó 15 horas del día del proestro los niveles de FSH comienzan a aumentar rápidamente y alcanzan el máximo entre las 17 y 19 horas del mismo día. Los niveles comienzan a descender poco después, pero hay un segundo incremento durante la mañana del día del estro.

La etapa preovulatoria del ciclo estral se caracteriza por el crecimiento de los folículos ováricos que conlleva una creciente secreción de estrógenos. Los niveles de E en plasma son bajos durante el estro y comienzan a incrementarse en la tarde del metaestro, para alcanzar su máximo alrededor del medio día del proestro, para comenzar a descender cerca de las 17 horas del día del proestro.

Hay dos picos en los niveles de P durante el ciclo estral, el menor ocurre durante la tarde del metaestro, y proviene del cuerpo lúteo recién formado tras la ovulación, el mayor se presenta en la tarde del día del proestro, alrededor de las 16 horas, antes de la ovulación. Esta secreción proviene del folículo preovulatorio. El incremento en los estrógenos desencadena un estímulo neural que activa la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por el hipotálamo, la que a su vez desencadena la secreción de LH para inducir la ovulación (Freeman 1988, Kalra y Kalra, 1983; Mahesh, 1985).

En la rata hembra, la conducta sexual se restringe al período comprendido entre la tarde del proestro (alrededor de las 17 horas) y la madrugada del día del estro, de tal manera que la conducta sexual se presenta cerca del momento de la ovulación, favoreciendo así las posibilidades de que la cópula sea fértil (Barfield *et al.*, 1984).

Esta estricta limitación temporal de la conducta sexual de la rata hembra condujo a los investigadores a pensar que se encuentra bajo control hormonal; dicha observación se ha confirmado por la extinción de la conducta en las ratas ovariectomizadas, en las cuales las concentraciones de E y P en suero disminuyen hasta ser prácticamente indetectables.

2.2 Conducta Sexual de la Rata Hembra.

El conjunto de patrones conductuales que presenta la hembra para establecer contacto con el macho y que se lleve a cabo la fecundación, se conoce como estro conductual o conducta de estro. En los roedores el estro dura entre 12 y 13 horas y se inicia y declina de manera gradual. En los mamíferos el estro tiene dos componentes fundamentales: la proceptividad y la receptividad. Las conductas proceptivas son todas aquellas que la hembra realiza para incitar al macho a establecer contacto sexual. En la rata se describen principalmente tres conductas de este tipo: a) orejeo: un movimiento rápido y repetitivo de la cabeza que produce vibración de las orejas, b) zigzagueo (“darting”): carreras cortas con rápidos cambios de dirección, tras de las cuales la hembra se detiene abruptamente, y c) brincoteo (“hopping”): la hembra avanza a pequeños saltos efectuados sobre sus cuatro patas, que concluyen con la adopción de una postura agazapada. La receptividad se expresa mediante las conductas que muestran una respuesta positiva a los intentos del macho por establecer contacto sexual. En la rata y en muchos otros mamíferos, el patrón conductual más representativo de la receptividad es la lordosis, que consiste en un arqueamiento de la columna dorsal que produce la elevación de la región perianal, asociado a un movimiento de la cola hacia un lado, colocando la pelvis en una posición que hace accesible la vagina a la intromisión peneana. Este patrón conductual se presenta en respuesta al estímulo de la monta por el macho (Beach 1976). La expresión de estas conductas permite el éxito reproductivo de la hembra.

2.3 Modulación Neuroendócrina de la Conducta Sexual.

2.3.1 Reflejo de Lordosis.

La monta del macho activa receptores de presión en los flancos y perineo de la rata hembra. Mediante desafección quirúrgica o farmacológica (Kow *et al.*, 1976) así como observaciones conductuales y el uso de un colorante, se ha logrado determinar la cantidad y calidad del estímulo necesario y suficiente para activar la lordosis en la hembra. Otros estímulos sensoriales no son necesarios ni suficientes (Kow y Pfaff, 1998). La presión proporcionada por el macho activa nervios sensoriales que proyectan hacia los ganglios de la raíz dorsal de la médula espinal, siendo L6 el ganglio más importante en esta ruta, el cual responde exclusivamente al estímulo táctil de presión (Kow y Pfaff, 1979). La mayoría de las neuronas que responden al estímulo de presión se encuentran en las láminas IV a VIII de la médula espinal, mientras que existen neuronas que participan en la proyección del estímulo en las láminas IV a X, exceptuando la IX (Kow *et al.*, 1980). Mediante transección de los haces nerviosos se mostró que la señal sensorial que inicia el reflejo de lordosis se transporta por la médula espinal hasta el tallo cerebral, alcanza la formación reticular ventral, principalmente el núcleo lateral reticular y el núcleo gigantocelularis (Hennessey *et al.*, 1990). El cerebelo no participa en esta conducta, ya que ratas hembra a las que se les ha dañado esta área, continúan llevando a cabo la lordosis (Zemlan y Pfaff, 1975).

En el núcleo gigantocelularis, se encuentra presente un grupo de neuronas reticuloespinales que sólo responde al estímulo de presión de la monta, lo que muestra que el estímulo se integra a la señal motora en la formación reticular mesencefálica (Kow y Pfaff, 1998). En presencia de niveles altos de estrógenos, se activan las neuronas de la sustancia gris periacueductal que reciben aferencias del hipotálamo. Éstas a su vez activan a las neuronas del núcleo gigantocelularis y las del núcleo vestibular lateral las que a su vez activan a las neuronas motoras espinales que innervan a los músculos posteriores bajos, dando como resultado la característica postura de lordosis (Blaustein y Erskine, 2002; Daniels y Flanagan-

Cato, 2000; González Mariscal y González-Flores, 2002; Calizo y Flanagan-Cato, 2003).

Ciertas neuronas de la sustancia gris periacueductal reciben aferencias directas del hipotálamo, mientras que en algunas de estas conexiones participan interneuronas. En la sustancia gris periacueductal se encuentran tanto receptores a estrógenos, como RPs inducidos por estrógenos (Turcotte y Blaustein, 1993; Calizo y Flanagan-Cato, 2003).

La lesión del cerebro medio impide la lordosis, lo cual muestra que no basta con el arco reflejo espino-bulbar para mediar esta conducta y la influencia de los estrógenos en el hipotálamo ventromedial es esencial (Kow y Pfaff, 1998; Blaustein, 2008).

Dicha influencia de los estrógenos está mediada por la liberación de una o más sustancias de transporte axoplasmático, ya que la administración de tetrodotoxina (la cual bloquea los canales de Na^+), o de colchicina (que bloquea el transporte axoplasmático) inhiben la lordosis (Meyerson 1982).

A continuación se muestra un esquema del circuito neural que permite desencadenar la respuesta de lordosis en la rata (Fig.2).

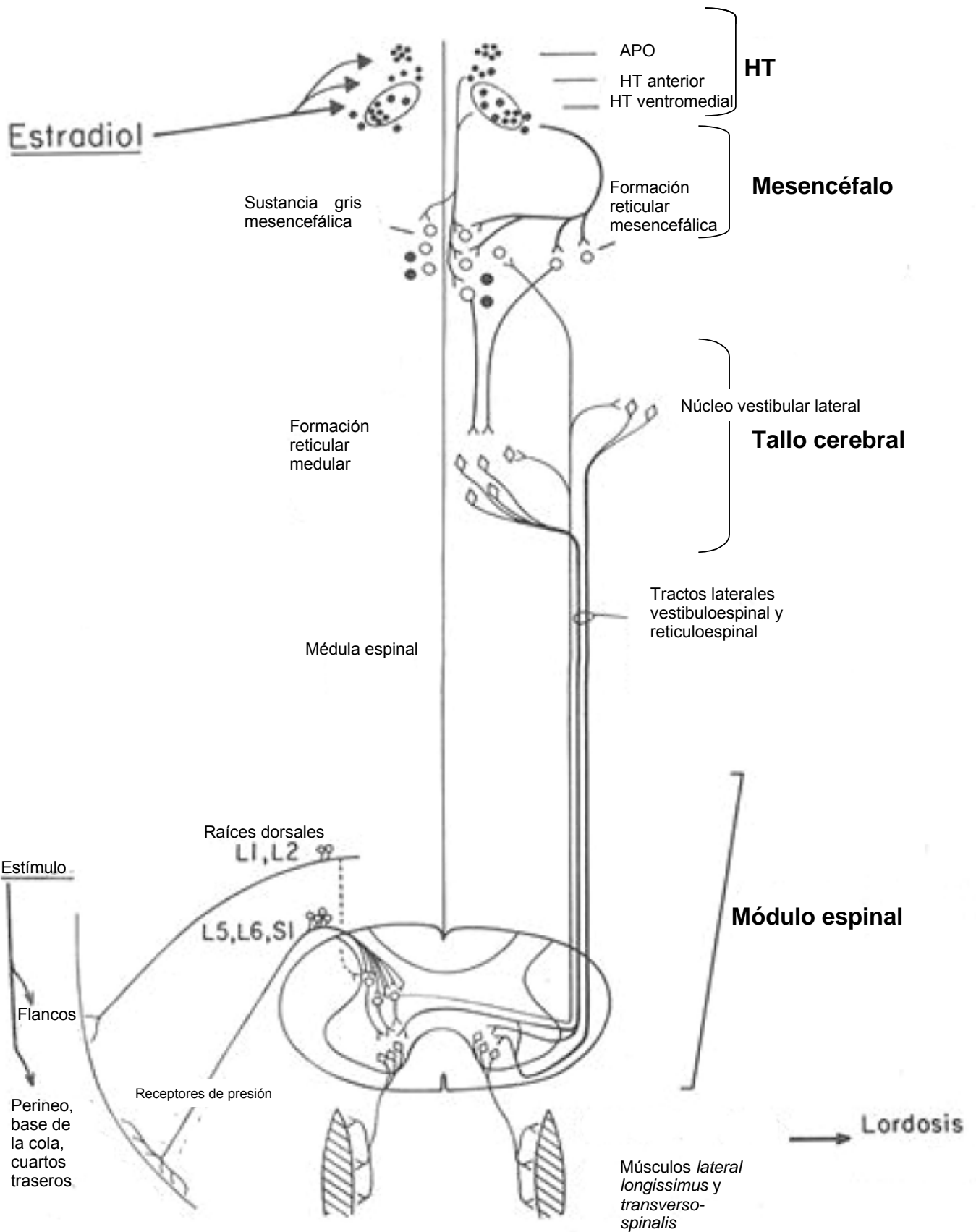


Fig. 2. Circuito Neural involucrado en el despliegue de la lordosis. Este circuito es bilateralmente simétrico. (tomado de Pfaff, 1999)

2.3.2. Hipotálamo

El hipotálamo es una región del cerebro que forma parte del diencefalo y se encuentra situada en la base del tercer ventrículo, por debajo del tálamo y por encima de la hipófisis. Su límite dorsal es el piso del tercer ventrículo, el límite anterior, el quiasma óptico y el límite posterior se localiza entre los cuerpos mamilares y la comisura posterior. La parte superior del hipotálamo da lugar al tallo hipofisario. En la zona dorsal el hipotálamo se une a la *zona incerta* y en su región caudal a la sustancia gris periacueductal y al área ventral tegmental del mesencéfalo (Carrive y Morgan, 2004). Desempeña un papel fundamental en la regulación del sistema nervioso autónomo y cumple una función integradora al regular las siguientes funciones (Halász, 2000):

- Control de la presión arterial y la composición electrolítica mediante mecanismos reguladores que van desde el control de la ingesta de líquidos y sal hasta el mantenimiento de la osmolalidad sanguínea y el tono vasomotor.
- Regulación de la temperatura corporal mediante el control de la termogénesis metabólica y desplazamiento hacia lugares cálidos o fríos (termotaxis).
- Control del metabolismo energético mediante la regulación de la ingesta de alimentos, la digestión y el metabolismo.
- Regulación de la reproducción mediante el control hormonal de la conducta sexual y materna.
- Control de la respuesta de emergencia a estímulos estresantes, incluidas las respuestas físicas e inmunológicas al estrés regulando el flujo sanguíneo a los distintos tejidos y la secreción de adrenalina.

Por su participación en las funciones mencionadas, el hipotálamo forma parte del sistema límbico, junto con los giros parahipocámpal y cíngulo, la amígdala y el hipocampo. Su participación es fundamental en el mantenimiento del ambiente

interno del organismo en un rango adecuado para el funcionamiento del organismo, es decir que participa en la homeostasis.

El hipotálamo se puede dividir anatómicamente en las siguientes regiones: área preóptica (APO), hipotálamo anterior, hipotálamo medial e hipotálamo posterior. Cada área se subdivide en media y lateral, y comprende varios núcleos que se distinguen por llevar a cabo funciones distintas y específicas.

El hipotálamo tiene conexiones vasculares con el lóbulo anterior de la hipófisis. Estos capilares sanguíneos se conocen como sistema porta hipotálamo-hipofisario, lo que permite que las hormonas que se sintetizan en el hipotálamo lleguen a la adenohipofisis, donde se sintetizan otras hormonas con acciones en diferentes órganos blanco (Bergland y Page, 1979). Las aferencias al hipotálamo provienen principalmente del cerebro anterior, especialmente de componentes del sistema límbico, y del tallo cerebral y la médula espinal. Las rutas eferentes del hipotálamo conectan algunos núcleos directamente con la médula espinal, enviando estímulos hacia neuronas aferentes de diversos órganos (Hall, 2001), mientras que otros proyectan hacia el hipocampo, la amígdala, el tálamo e incluso a la corteza cerebral (Heimer y Van Hoesen, 2006). También se comunica con la neurohipofisis y mediante los axones de esta ruta libera hormonas peptídicas en dicha región hipofisaria, como la oxitocina y la vasopresina (Guillemin, 1978).

El hipotálamo medial comprende, entre otros núcleos, el núcleo hipotalámico ventromedial (HVM), el cual tiene proyecciones neuronales hacia regiones del cerebro anterior y tallo cerebral que contienen células que expresan receptores a hormonas esteroideas involucradas en la regulación de la conducta sexual; algunas de estas regiones son la amígdala medial y el APO, en el propio hipotálamo.

El APO pertenece, por su ontogenia al prosencéfalo, sin embargo, pertenece funcionalmente al hipotálamo. El APO es la región más anterior del hipotálamo, se extiende hacia delante desde el quiasma óptico hasta la lámina terminal y la

comisura anterior y forma parte de las paredes del tercer ventrículo. Algunas neuronas de la región media del APO contienen hormona liberadora de gonadotropinas. Estas neuronas proyectan hacia la eminencia media, por lo que se considera que regulan la liberación de hormonas hipofisarias. Los núcleos del APO y el hipotálamo anterior muestran dimorfismo sexual lo que depende de la exposición perinatal a los esteroides gonadales (Allen *et al.*, 1989). Una de las funciones del APO es la regulación de los ciclos de sueño-vigilia, así como de las fases de sueño MOR (movimientos oculares rápidos) y no-MOR, funciones en las que también participa el hipotálamo medio basal (Szymusiak *et al.*, 2007; Peterfi *et al.*, 2009); también está involucrada, junto con el hipotálamo posterior, en la termorregulación (Morrison y Nakamura, 2011).

La participación del hipotálamo como región cerebral crítica para la modulación de la conducta sexual de la hembra, así como la identificación de los principales núcleos involucrados en la regulación de esta conducta se ha analizado empleando dos aproximaciones técnicas: la lesión de zonas específicas en el SNC y la estimulación de estas zonas, ya sea eléctrica o mediante implantes hormonales intracraneales. Las lesiones en el HVM suprimen la lordosis inducida por E, si bien la extinción de la conducta tiene una latencia de 48 h tras la lesión. Este procedimiento no elimina por completo la conducta sexual cuando es inducida por la administración de E y P (Mathews y Edwards, 1977; Blaustein y Erskine, 2002). La estimulación eléctrica del HVM puede inducir la lordosis o incrementarla en ratas ovariectomizadas y pretratadas con E (Sakuma y Pfaff, 1980).

Las lesiones del APO incrementan la receptividad sexual y reducen el umbral de la dosis de E necesaria para inducir la lordosis (Powers y Valenstein, 1972; Blaustein y Erskine, 2002) mientras que la estimulación eléctrica inhibe la receptividad (Sakuma y Pfaff, 1980). Algunos estudios muestran que las lesiones en esta área pueden eliminar las conductas proceptivas (Hosina *et al.*, 1994; Yang y Clements, 2000), lo que muestra que las neuronas del APO participan en la modulación de la conducta sexual en forma bastante compleja, con efectos opuestos. La

interrupción de eferencias del APO también facilita la conducta de lordosis, extendiendo el período de receptividad (Modianos *et al.*, 1976).

Los implantes de E y P incrementan la expresión de lordosis al ser colocados en la formación reticular, APO y HVM. Trabajos como los de Rubin y Barfield (1983) y Etgen y Barfield (1986) han mostrado que la estimulación del HVM mediante implantes de E y P es suficiente para facilitar la conducta sexual de la hembra.

2.3.3. Hormonas y neurotransmisores que participan en la regulación de la conducta sexual en la rata hembra.

Si bien el E y la P son las hormonas principales en la regulación de la conducta de estro, ésta es modulada por una compleja red de interacciones entre hormonas y neurotransmisores, que actúan sobre los centros nerviosos de integración que controlan este comportamiento clave para la preservación de la especie.

Varios neurotransmisores modulan la conducta de estro, entre los cuales se encuentran:

Dopamina. Las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio que proyectan a los ganglios basales participan en la ejecución de movimientos estereotipados, como los patrones proceptivos (por ejemplo “orejeo”). La dopamina incrementa la lordosis en ratas hembras que han recibido un tratamiento hormonal que induce un bajo cociente de lordosis (Paredes y Agmo, 2004). En la rata la administración subcutánea de E incrementa la liberación de dopamina en el núcleo accumbens y el estriado (Mermelstein and Becker, 1995), mientras que la administración de P produce el mismo efecto en el área preóptica media (Matuszewich *et al.*, 2000). En la rata la sola presencia del macho incrementa la liberación de dopamina en el estriado y en el núcleo accumbens se incrementa tras la cópula. En el APO, el incremento en la liberación de dopamina depende del control de hembra sobre el tiempo que comparte con el macho (Paredes y Agmo, 2004). Esto podría deberse a la participación de la dopamina en la motivación y recompensa, ya que se ha reportado que la cópula es más gratificante para la hembra cuando es ella quien

controla completamente el contacto con el macho (García-Horsman y Paredes, 2004).

Algunos metabolitos de la P, tales como la $3\alpha, 5\alpha$ -THP actúan en el área tegmental ventral del cerebro medio y facilitar la lordosis, al interactuar con receptores a dopamina tipo 1 (D1). Las progestinas incrementan la densidad de D1 en el estriado y los niveles de dopamina en el cerebro medio. Los antagonistas para D1, al ser inyectados en el área tegmental ventral, reducen la lordosis inducida por P, mientras que los agonistas la incrementan (Frye y Walf, 2008).

Noradrenalina. Los cuerpos celulares que contienen noradrenalina están ubicados en el *locus caeruleus*, el bulbo raquídeo y la médula, y proyectan neuronas hacia el hipotálamo, el tálamo, el sistema límbico y la corteza cerebral. Los receptores α 1-noradrenérgicos, en el HVM o APO podrían participar en la activación de la lordosis, ya que la infusión de noradrenalina en dichas áreas cerebrales en ratas pretratadas con estrógenos incrementa la receptividad. La administración subcutánea de estrógenos induce la síntesis de estos receptores en el hipotálamo ventromedial (Mong y Pfaff, 2004). Los fármacos que bloquean los receptores α 1-adrenérgicos reducen la lordosis. La administración directa de noradrenalina incrementa la actividad eléctrica en el hipotálamo ventromedial. Si se dañan los axones de las neuronas noradrenérgicas del *locus caeruleus* que proyectan al hipotálamo se bloquea la lordosis (Carter, 1992). El tratamiento con agonistas de los receptores α 1-adrenérgicos evita el incremento de RP inducido por E. Varios estudios han mostrado que el efecto de la noradrenalina sobre la lordosis se lleva a cabo a través del incremento de diacilglicerol, que activa la proteína-cinasa C, y del incremento en el inositol-3-fosfato, el cual moviliza el calcio intracelular. Ambas acciones llevan a la apertura de canales de calcio tipo L y al consecuente aumento de óxido nítrico, el cual a su vez estimula la guanilil ciclasa, favoreciendo la síntesis de GMPc que activa la proteína-cinasa G. Si se bloquea cualquier paso de esta ruta, se inhibe la conducta de lordosis (Etgen et al; 1999; Mong y Pfaff, 2004).

Acetilcolina (ACh). En las hembras los estrógenos incrementan la actividad de la colin-acetiltransferasa, (necesaria para la síntesis de ACh), así como el número de receptores a ACh en el HVM, sólo en las hembras. En el HVM las neuronas que presentan receptores a estrógenos también expresan receptores a ACh. La infusión de ACh en el HVM o en el fluido cerebroespinal incrementa la lordosis, mientras que la administración de antagonistas para los receptores a ACh inhiben la receptividad (Dohanich *et al.* 1981).

Serotonina (5-HT). La serotonina reduce la actividad secretora de la hipófisis. Los fármacos que inhiben la serotonina facilitan la lordosis en varias especies. Sin embargo, la acción de la serotonina depende de qué subtipo de receptor se active. Mientras la activación de los receptores 5-HT_{1A} reduce la conducta de lordosis, la activación de los recptores 5-HT_{2A} y 2C facilitan el reflejo de lordosis. Se ha sugerido que la expresión de estos receptores puede modular la capacidad de las hembras para reprimir la conducta de lordosis cuando las condiciones del medio sean inadecuadas. La expresión de los receptores a 5-HT es modulada por estrógenos (Uphouse, 2000).

GABA. El ácido gamma-aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio cerebral. Los fármacos que bloquean GABA facilitan la lordosis mientras que los que estimulan sus receptores inhiben el comportamiento sexual. Aparentemente, bloquear los receptores a GABA incrementa la sensibilidad a los estímulos somatosensoriales ligeros, lo que podría aumentar el efecto de estímulos proporcionados por el macho. El GABA también participa en la liberación de oxitocina por lo cual también puede ejercer un efecto indirecto en el comportamiento sexual (Carter, 1992).

Entre las hormonas que se ha descrito que participan en la regulación del estro en roedores se encuentran:

Prolactina. Las neuronas que contienen prolactina en el núcleo arcuato del hipotálamo proyectan a la sustancia gris central del cerebro medio. Hay receptores a prolactina en el HVM. Las infusiones de prolactina en esta área pueden facilitar la lordosis en ratas pretratadas con dosis bajas de estrógenos, y la iontoforésis de prolactina en esa área incrementa la actividad eléctrica neuronal local. La

administración de prolactina en ratas pretratadas con E incrementa la receptividad sexual, pero tiene el efecto contrario en ratas a las que se les ha administrado E+P. En ratas en estro la supresión farmacológica de la liberación de prolactina atenúa la receptividad (Dudley *et al.*, 1982).

GnRH. Los axones de neuronas GnRHérgicas, además de proyectar hacia el sistema porta, también lo hacen a la sustancia gris pericuaductal del cerebro medio. Así, la GnRH también se puede liberar en dicha área del cerebro e incrementar la probabilidad de que ocurra la lordosis. La administración de GnRH localmente en la sustancia gris central del cerebro medio, incrementa la respuesta de lordosis. Los anticuerpos para GnRH administrados en dicha área inhiben la lordosis (Gómora-Arrati *et al.*, 2008).

Oxitocina (OT). La estimulación cervical durante la cópula provoca la liberación de OT (Baskerville y Douglas, 2008). La OT estimula el comportamiento sexual en ratas hembra que han sido pretratadas con dosis subumbral de estrógenos, P o ambos, e incrementa la frecuencia y duración de la lordosis durante el estro. El E induce un incremento en los receptores a OT en el HVM. Concentraciones bajas de OT pueden suprimir la lordosis si se administran en el ventrículo lateral de la rata hembra (Baskerville y Douglas, 2008). Las ratas implantadas con OT en el HVM mostraron menor agresividad y mayor contacto físico con el macho, mientras que la infusión de antagonistas de OT en el APO media antes de la administración de P inhibe la actividad sexual e incrementa el rechazo hacia el macho. Las infusiones intrahipotalámicas de oligonucleótidos antisentido contra el mRNA del receptor para OT reducen la conducta de lordosis. En hamsters ovariectomizadas pretratadas con E la microinyección de OT en APO o en HVM induce receptividad sexual e incrementa las vocalizaciones proceptivas (Neumann, 2008; Carter, 1992).

Estrógenos. Los estrógenos, principalmente el 17- β E, actúan a través de su receptor intracelular (Roy y Wade, 1977; Blaustein; 2008), sensibilizando a los sustratos neurales, como el HVM y el APO e incrementando la expresión del RP en dichas áreas relacionadas con la modulación de la conducta sexual de la hembra (Kastner *et al.*, 1990; Camacho-Arroyo *et al.*, 1994; Schumacher y Robert,

2002). La activación de los centros neurales hipotalámicos por el E y la P determina que el estímulo sensorial producido por la monta del macho active la lordosis. Los implantes de E en el HVM facilitan la lordosis. En hembras ovariectomizadas la administración de E, basta para inducir lordosis, aunque con menor intensidad que si se administra una inyección posterior de P (Blaustein, 2008).

Acción de la P en la modulación de la conducta sexual en la rata.

En las hembras ovariectomizadas, la administración de dosis altas de E estimula la receptividad sexual, pero no con la intensidad con la que se observa en los animales a los que se les administra E y P. Las hembras tratadas con E no presentan conductas proceptivas, por lo cual se propone que la P es necesaria para el despliegue de la conducta sexual completa en la rata hembra. También se describe una correlación entre el curso temporal de la respuesta conductual y el incremento y disminución de la P circulante (Barfield y Lisk, 1974; Blaustein y Erskine, 2002).

La administración de P a las ratas hembras ovariectomizadas pretratadas con E produce la expresión de la conducta de estro. Sin embargo, esta exposición hace que el animal entre en un período refractario, durante el cual no responde a una segunda administración de P. Este fenómeno se conoce como “inhibición secuencial” y se considera que tiene la función de limitar la conducta sexual a la etapa periovulatoria. De esta forma, la P es esencial tanto para el inicio como para el fin del período de respuesta sexual (González-Flores *et al.*, 2004).

Mediante el uso de hormonas marcadas con isótopos radiactivos, se identificó el hipotálamo como la principal región del cerebro en la que se acumulan las hormonas ováricas (Warembourg 1978). Las lesiones en el hipotálamo también impiden la acción hormonal en la conducta sexual, mientras que el implante de pequeñas dosis de P directamente en el HVM y el APO han confirmado la

facilitación de la conducta sexual y la inhibición secuencial por acción de esta hormona en el hipotálamo. El sitio más sensible a la acción de la P en el hipotálamo de la rata es la zona lateral del HVM. En ratas pretratadas con E la aplicación de P directamente en este núcleo facilita la expresión de la conducta sexual completa, tanto de la receptividad como de la proceptividad. Mediante experimentos con implantes hormonales se han identificado otras regiones cerebrales en las que la P facilita la conducta sexual, especialmente la formación reticular mesencefálica y la habénula (Pfaff, 1999).

En el cerebro, la P provoca sus efectos a través de varios mecanismos de acción, principalmente interactuando con sus receptores específicos.

Evidencias de la participación del RP en la conducta sexual

Varios estudios muestran que la conducta de estro en roedores es modulada a través del RP: En un trabajo realizado en hembras del cobayo ovariectomizadas y pretratadas E con, Blaustein y Feder (1979) encontraron que la expresión del RP en el HVM y en el APO precede al inicio de la conducta de apareamiento inducida por la administración de P. También hallaron una considerable reducción en la expresión del RP en las mismas áreas cerebrales durante el período refractario de la conducta sexual. Parsons *et al.* (1981) confirmaron estos hallazgos en el cerebro de la rata. Estudios posteriores mostraron que la administración de un antagonista del RP (RU 486), así como la interferencia con la síntesis del receptor mediante la administración del oligonucleótido antisentido para el RNA mensajero del RP en el hipotálamo de hembras ovariectomizadas, inhibe la conducta de estro inducida por la exposición secuencial a E y P, además de disminuir la expresión del RP (Brown y Blaustein, 1984; Etgen y Barfield, 1986; Pollio *et al.*, 1993; Mani *et al.*, 1994; Ogawa *et al.*, 1994; Guerra-Araiza *et al.*, 2009). El incremento en la expresión del RP por inhibición del proteosoma 26S en el hipotálamo disminuye la inhibición secuencial de la conducta de lordosis (González Flores *et al.*, 2004). Las hembras de ratón que no expresan el RP (Knockout), tampoco despliegan la conducta de lordosis inducida por P (Lydon *et al.*, 1995; Mani *et al.*, 1997).

2.4 Receptores Intracelulares a P (RP)

El RP pertenece a la familia de receptores intracelulares a hormonas esteroides, cuyos miembros regulan la expresión de genes en respuesta a la unión con su ligando (Kastner *et al.*, 1990). El RP es un factor de transcripción que regula la expresión de genes blanco involucrados en el metabolismo, desarrollo y reproducción, a través de la interacción con secuencias específicas en el ADN, los elementos de respuesta a hormonas (ERH). Este receptor presenta dos isoformas: una larga denominada RP-B (110-120 KDa) y una corta denominada RP-A (80-94 KDa) (Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo, 2000; Camacho-Arroyo *et al.*, 2007). Ambas isoformas se generan a partir del mismo gen pero son reguladas por distintas regiones promotoras. En los mamíferos, específicamente en el humano, el gen del RP está localizado en el cromosoma 11q22,23. El tamaño de este gen es de aproximadamente 90 kb y comprende 8 exones y 7 intrones (Misrahi *et al.*, 1993). La identidad entre los genes del RP del humano y de la rata es de un 85% y la identidad entre las proteínas de un 96% (Park-Sarge y Mayo, 1994).

La presencia del RP se ha detectado en diferentes órganos de distintos grupos de vertebrados, en tejidos del aparato reproductivo, tales como la granulosa del ovario, trompas de Falopio, vagina, testículo y glándula mamaria (Milgrom y Baulieu, 1970; Ternier, 1977; Pollow *et al.*, 1978; González-Morán y Camacho-Arroyo, 2001) en oviducto y bolsa de Fabricio de aves (Ylikomi *et al.*, 1985; González-Morán y Camacho-Arroyo, 1998; Camacho-Arroyo *et al.*, 2007), así como en tejidos no pertenecientes al aparato reproductivo, como en el miocardio y en el músculo liso de las arterias (Ingegno *et al.*, 1988), en el timo (Pearce *et al.*, 1983), los islotes pancreáticos (Green *et al.*, 1978), las células osteoblásticas (Gunn *et al.*, 1999), el pulmón (Camacho-Arroyo *et al.*, 1994) y en distintas áreas del cerebro como el hipotálamo, APO, hipocampo y corteza cerebral (Camacho-Arroyo *et al.*, 1998; Guerra-Araiza *et al.*, 2002; Camacho-Arroyo *et al.*, 2007).

2.4.1 Estructura

El RP tiene una estructura modular organizada en cuatro dominios funcionales (Fig. 3):

- a) Dominio amino terminal (región A/B): Se codifica a partir del exón 1 (2380 pdb). Contiene funciones de transactivación que regulan la especificidad del promotor, por lo que participa en la regulación de la transcripción de genes blanco (Bai y Weigel, 1995).
- b) Dominio de unión al ADN (región C): Se codifica a partir de los exones 2 (152 pdb) y 3 (117 pdb). Contiene dos dedos de zinc de tipo II a través de los cuales interactúa con el ADN. También participa en la dimerización con otra molécula del RP.
- c) Dominio bisagra (región D): Se codifica a partir del exón 4 (306 pdb). Contiene el péptido de localización nuclear, también participa en procesos de estabilización del receptor por unión a proteínas de choque térmico.
- d) Dominio de unión al ligando (región E): Se codifica a partir de los exones 5 (145), 6 (131), 7 (158) y 8 (153 pdb). Contiene una función de transactivación. Participa en la interacción con el ligando y en la regulación de la transcripción.

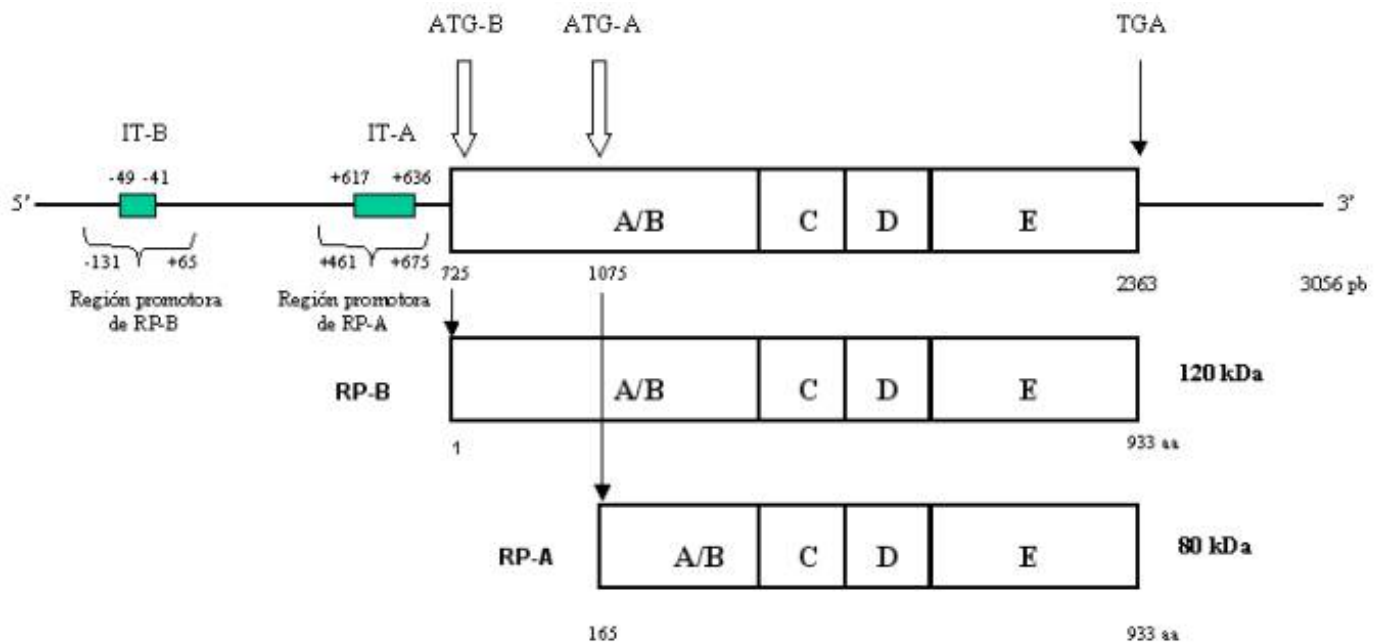


Fig 3. Estructura del RP de la rata y organización de sus dos isoformas.

IT-B e IT-A: sitios de inicio de la transcripción de las isoformas RP-B y RP-A, respectivamente; A-E dominios funcionales del RP; ATG-B y ATG-A: sitios de inicio de la traducción de las isoformas RP-B y RP-A, respectivamente; TGA: codón de término de la traducción (Kraus *et al.*, 1993; Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo, 2000).

El RP es una fosfoproteína cuya actividad puede ser regulada por fosforilación (Sheridan *et al.*, 1989., Zhang *et al.*, 1997). La regulación de distintas vías de señalización celular altera el patrón de fosforilación y la actividad del RP (Beck *et al.*, 1992; Takimoto *et al.*, 1996) así como de otros receptores a hormonas esteroides (Ignar-Trowbridge *et al.*, 1992; Rogatsky *et al.*, 1999). Algunos de estos cambios se deben a alteraciones directas en la fosforilación del RP, mientras que otros parecen afectar a proteínas asociadas (Rowan *et al.*, 2000). La fosforilación es un evento muy importante en la transactivación de genes mediada por P. El RP humano contiene al menos 14 sitios de fosforilación, identificados mediante ensayos de fosforilación *in vitro* e *in vivo*, todos ellos localizados en las serinas: 20, 25, 81, 102, 130, 162, 190, 213, 294, 346, 400, 430, 554, 676 (Zhang *et al.*, 1994, 1995; Lange *et al.*, 2000; Knotts *et al.*, 2001). Hasta el momento no se han realizado estudios sobre los sitios de fosforilación en la rata, sin embargo, a través

de algoritmos bioinformáticos (Mac. Vector y NetPhos 2.0) se han identificado 37 residuos de serina en el RP de la rata que podrían ser fosforilados, tales residuos de serina son: 15, 26, 43, 50, 80, 89, 94, 98, 113, 122, 130, 162, 166, 170, 190, 202, 232, 276, 281, 344, 399, 439, 443, 450, 468, 488, 539, 542, 575, 576, 703, 747, 757, 786, 829, 857, 869, 888. Estos residuos podrían ser fosforilados por cinasas como la proteína cinasa C (PKC), la proteína cinasa A (PKA), caseína cinasas I y II (CKI y CKII), la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK-3), la cinasa II dependiente de calmodulina (CaMKII), la Cdc² y la proteína cinasa G (Poletti *et al.*, 1993).

El receptor fosforilado presenta una alta afinidad por los ERH (Mahesh *et al.*, 1996; Beato, 1989). La fosforilación del RP humano en el residuo Ser²⁹⁴ es necesaria para la ubiquitinación del receptor y su degradación por el proteosoma 26S (Lange *et al.*, 2000).

2.4.2 Isoformas del RP

Se han identificado dos isoformas del RP, denominadas RP-A (80-94 KDa) y RP-B (110-120 KDa). La isoforma RP-B presenta 164 aminoácidos más en la región amino terminal que la isoforma RP-A. Ambas isoformas se han identificado en diversas especies de roedores, primates y aves (Camacho-Arroyo *et al.*, 1998; Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo, 2000; Camacho-Arroyo, 2003).

En el ser humano y la rata, ambas isoformas son codificadas por el mismo gen pero se transcriben a partir de dos secuencias promotoras distintas, una distal, que promueve la transcripción de la isoforma RP-B, y otra proximal, que promueve el inicio de la transcripción de RP-A; lo cual da origen a diferentes mRNA (Kastner *et al.*, 1990, Kraus *et al.*, 1993).

La proporción de ambas isoformas varía según la especie y el tejido al que pertenezcan las células en que se expresan. La proporción de estas isoformas varía en respuesta a estímulos hormonales, por lo que cambia durante el desarrollo y en las distintas fases del ciclo reproductivo, además de encontrarse diferencias en el patrón de expresión de mRNA de estas isoformas entre los sexos (Guerra-Araiza *et al.*, 2001, 2002).

Estudios bioquímicos muestran que ambas isoformas tienen la misma afinidad por la P y por los ERH (Christensen *et al.*, 1991). El RP tiene la capacidad de formar tres especies diméricas: AA, AB, BB. La transcripción mediada por el RP es diferente cuando se forman homodímeros o heterodímeros (Leonhardt *et al.*, 1998).

Las isoformas del RP difieren en sus funciones dependiendo del tipo celular en que se encuentren, del gen blanco y del promotor (Camacho-Arroyo *et al.*, 2007). En varios sistemas celulares la isoforma RP-B actúa como activador transcripcional, mientras que la isoforma RP-A reprime la actividad transcripcional mediada por RP-B así como por otros receptores a hormonas esteroides. Algunos genes son activados principalmente por RP-B, mientras que otros responden igualmente a ambas isoformas (Vegeto *et al.*, 1993, Clemm *et al.*, 1995). En el útero del ratón RP-A regula los genes de la calcitonina y anfiregulina, mientras que RP-B a los de histidina descarboxilasa y lactoferrina (Mulac-Jericevic *et al.*, 2000).

RP-A puede reprimir la actividad transcripcional de otros receptores a hormonas esteroides, como el receptor a estrógenos, los receptores a glucocorticoides y mineralocorticoides. Esto permite que el RP-A medie las acciones de la P al mismo tiempo que regula los efectos de otras hormonas, participando en la integración de señales mediadas por otros receptores a hormonas (Camacho-Arroyo, 2003).

Las diferencias en la actividad transcripcional de cada isoforma del RP pueden ser relacionadas con sus diferencias estructurales, ya que la isoforma RP-A carece de 164 aminoácidos presentes en el extremo amino terminal de la isoforma RP-B (Graham *et al.*, 1995). El RP-A contiene solamente dos regiones con funciones de activación (AF1 y AF2), mientras que el RP-B presenta una región de activación más (AF-3) que se encuentra en el extremo amino terminal ("B-upstream" o BUS) (Giangrande and McDonnell 1999). También se presenta una región de acción inhibitoria localizada en la región adyacente a AF1 que es funcional sólo en RP-A.

Esta región bloquea la activación de la transcripción mediada por AF1 y AF2, pero no por la región presente sólo en RP-B: AF3 (Huse *et al.*, 1998).

Característica	RP-A	RP-B
Peso molecular	72-86 KDa	110-120 KDa
Región N-terminal	Trunca	Completa
Funciones de activación	2	3
Función de inhibición	Activa	Inactiva
Sitios de fosforilación	9	14
Preferencia en la unión a cofactores	Correpresores	Coactivadores
Principal actividad transcripcional	Represora	Activadora
Propiedad de transrepresor	Sí	No

Tabla 1. Diferencias entre las isoformas del RP (Tomado de Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006).

Ambas isoformas presentan diferente afinidad a coactivadores o correpresores de la transcripción: el RP-A presenta mayor afinidad a correpresores como el SMRT y es ineficiente en el reclutamiento de coactivadores como la proteína que interactúa con el receptor a glucocorticoides-1 (GRIP-1) y SRC-1 (Giangrande y Pollio, 1997), mientras que el RP-B es más afín a coactivadores como el SRC-1 (Camacho-Arroyo, 2003). La tasa de expresión de los coactivadores respecto a los correpresores dentro del ambiente celular influye en la actividad transcripcional de cada isoforma, provocando que en algunos casos el RP-A no ejerza su actividad represora (Camacho-Arroyo, 2003; Camacho-Arroyo *et al.*, 2005).

Los homodímeros son más estables que los heterodímeros. Los homodímeros B:B tienen una mejor actividad transcripcional que los heterodímeros A:B, mientras que los homodímeros A:A son los que presentan la menor actividad transcripcional (Leonhardt *et al.*, 1998). Las isoformas del RP presentan diferencias en la distribución y regulación de los sitios de fosforilación, las cuales pueden dar origen a diferentes estados conformacionales con mayor o menor afinidad por las

secuencias blanco en el ADN y así intervenir en la regulación de la transcripción de un gen. El RP humano es fosforilado al menos en catorce residuos. Seis de estos sitios sólo se encuentran en el RP-B mientras que los otros ocho los comparten ambas isoformas (Knotts et al., 2001, Kariagina, 2008).

En células de cáncer endometrial las dos isoformas de RP tienen distinta localización subcelular; el RP-B se localiza principalmente en el citoplasma, mientras que el RP-A se encuentra en el núcleo (Lim et al., 1999), lo cual apunta a que, en ausencia del ligando el RP-B puede ejercer efectos no genómicos en el citoplasma, mientras que el RP-A puede actuar en forma ligando independiente en el núcleo. Estos datos apoyan la sugerencia de que las alteraciones en la expresión o actividad de las isoformas del RP puede tener importantes consecuencias en la capacidad de respuesta a la P4 (Mote et al., 1999; Guerra-Araiza et al., 2009).

En muchos tejidos blanco, como el útero y el hipotálamo, el E regula de manera estimulante el RP, mientras que la P lo regula de manera inhibitoria (Camacho-Arroyo et al., 1994; Mendoza-Rodríguez et al., 1999; Guerra-Araiza et al., 2003).

El incremento en la presencia del RP por estrógenos, como el E, se debe a que en el promotor se encuentran ERH. Por ejemplo, en la rata hay dos ERH en la región del promotor para RP-A, uno completo, que contiene una secuencia palindrómica que varía en dos nucleótidos de la secuencia consenso, la cual se ubica en la posición +615/637 del gen del RP, así como otro sitio que únicamente contiene la mitad del ERH, en la posición +462/+466 (Kraus y Katzenellenbogen, 1993^a, Kraus et al., 1994).

En la región del promotor para RP-B no se han detectado ERH, sin embargo, se han determinado sitios de unión al factor de transcripción conocido como proteína específica 1 (Sp1) en la posición -49/-41 (Kraus et al., 1993), que puede actuar junto con el receptor a estrógenos y promover la transcripción del RP.

En el cerebro de la rata, la expresión de ambas isoformas está regulada en forma diferencial por el E. En el APO el E modula la expresión del mRNA de la isoforma RP-B, mientras que en el hipotálamo, induce la expresión de mRNA para ambas isoformas (Camacho-Arroyo et al., 1998). La expresión de mRNA para ambas

isoformas varía a lo largo del ciclo estral en forma región-específica. La expresión del RP-B es predominante en el metaestro en el APO, mientras que se expresa más durante el proestro en el resto del hipotálamo (Guerra-Araiza *et al.*, 2000). Hay variaciones en la expresión de las isoformas del RP cuando el individuo pasa de la etapa juvenil a la madurez sexual (Guerra-Araiza *et al.*, 2001). Estudios en cepas de ratones Knockout que no expresan las dos isoformas de RP o bien sólo expresan RP-A, se mostró que RP-A es esencial para el despliegue de la conducta sexual en respuesta a la acción de P, si bien RP-B también tiene un papel importante (Mani *et al.*, 2006), mientras que en la rata, un estudio con oligonucleótidos antisentido muestra que el RP-B es la isoforma esencial para el despliegue de la conducta de lordosis en hembras tratadas con E y P (Guerra-Araiza *et al.*, 2009).

La P disminuye la cantidad de RP al promover la fosforilación, específicamente de la serina 294, esto permite que el RP sea ubiquitinado y a continuación degradado por el proteosoma 26S, sistema utilizado por la célula para degradar proteínas con una vida media corta, como son los factores de transcripción, reguladores del ciclo celular y proto-oncogenes. Las proteínas degradadas por el proteosoma necesitan estar ubiquitinadas. La inhibición de la actividad del proteosoma 26S incrementa el contenido celular del RP, aún en presencia de su ligando, lo que muestra que el proteosoma 26S es un importante mediador molecular en la regulación del RP por parte de la P (González-Flores *et al.*, 2004).

2.4.3. Mecanismo de acción del RP

El mecanismo de acción genómico del RP se conoce también como mecanismo de acción clásico y se lleva a cabo de la siguiente manera:

La P entra en la célula por difusión simple, y al llegar al núcleo se une al RP. La estructura del cristal del dominio de unión al ligando forma un bolsillo, en el cual la molécula de P interactúa con el receptor mediante el grupo NH₂ de la glicina 725

del RP y el grupo 3-ceto de la P, lo cual provoca un cambio conformacional mediante el reposicionamiento de una de las 12 α -hélices del dominio de unión al ligando, lo que permite la disociación de las proteínas chaperonas que estaban unidas al receptor inactivo, así como la fosforilación del receptor. A continuación el RP se dimeriza e interactúa con los ERH en el ADN mediante los dedos de zinc; esta interacción se lleva a cabo en la región promotora del gen blanco (gen regulado por P). Los ERH son secuencias palindrómicas imperfectas. La secuencia consenso de los elementos de respuesta a P consta de dos secuencias de seis pares de bases, orientada en forma palindrómica con tres pares de bases intermedios. La interacción mencionada induce una nueva fosforilación del receptor que favorece el reclutamiento de coreguladores, que remodelan la cromatina, así como componentes de la maquinaria basal de la transcripción, modificando la expresión de los genes blanco (Fig.4.) (Tsai y O'Malley, 1994., Beato y Klung, 2000). Una vez que se ha llevado a cabo la transcripción, el RP y la maquinaria transcripcional se desensamblan del gen blanco y el receptor regresa a la fase inactiva. Ahora el RP puede ser degradado por la vía ubiquitina-proteosoma (Camacho-Arroyo *et al.*, 2002., Camacho-Arroyo y Rodríguez Dorantes, 2006).

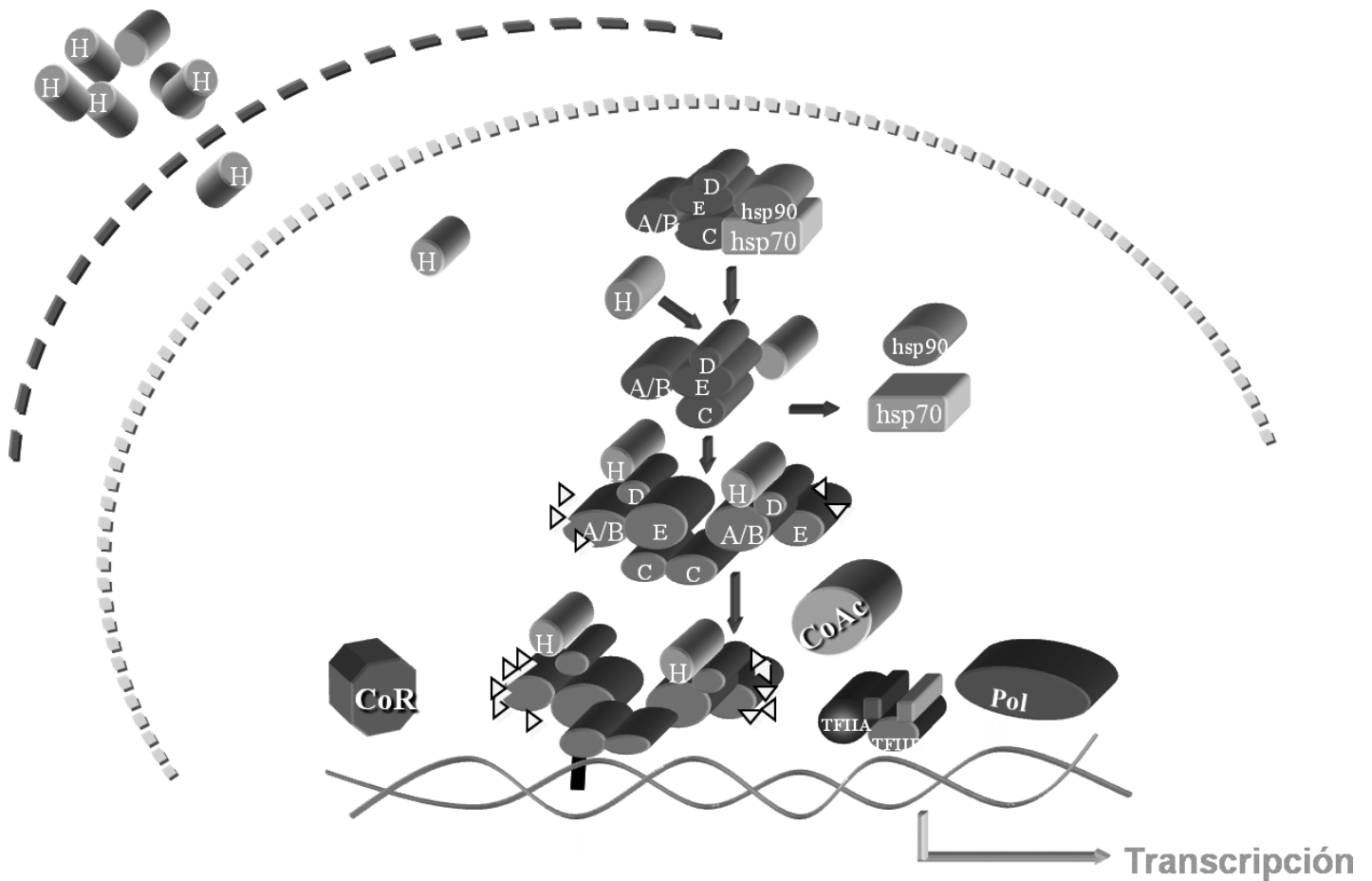


Fig. 4. Regulación de la expresión génica por P a través del receptor intracelular. El RP, en ausencia del ligando se encuentra unido a proteínas chaperonas tales como las proteínas “heat shock” HSP90 y HSP70. Tras la unión de P, RP se disocia de sus proteínas chaperonas y se dimeriza con otra molécula de RP, entonces el RP es fosforilado (triángulos) y forma complejos con cofactores como el coactivador SRC-1 o el correpresor SMRT. El RP interactúa con elementos de respuesta a hormonas (HRE) en la región promotora de los genes blanco para P, lo cual también induce fosforilación del RP y se recluta la maquinaria basal de la transcripción (BTM). A/B, C, D, E y F son dominios del RP (tomado de Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006).

En diversos tipos celulares el RP se encuentra localizado principalmente en el núcleo, incluso en ausencia de su ligando. Las dosis altas de E que son capaces de producir la lordosis, favorecen que el RP se concentre en el núcleo en las neuronas del hipotálamo, lo cual podría explicar el efecto del E en la activación de la conducta sexual sin administración de P (Gasc *et al.*, 1989). En el RP se ha

identificado una señal de localización nuclear mediante experimentos de mutagénesis dirigida. Estas señales son secuencias cortas ricas en argininas y lisinas, necesarias para la interacción con las proteínas del poro nuclear. La señal de localización nuclear identificada en el RP es una secuencia de 61 aminoácidos localizados entre la región de bisagra y el segundo dedo de zinc. Una parte de esta secuencia se activa sólo en presencia del ligando (Guiochon-Mantel *et al.*, 1989). La localización nuclear del RP es un proceso dinámico continuo durante el cual el receptor entra al núcleo por transporte activo, dependiente de energía, y sale por difusión (Tyagi *et al.*, 1998).

La acción de la hormona es específica para cada tipo celular, de modo que el receptor tiene funciones distintas dependiendo de su contexto celular, Truss y Beato (1993) mencionan cuatro factores que contribuyen a la especificidad de la acción hormonal en la célula: 1) la presencia de proteínas reguladoras y factores de transcripción específicos en cada célula, 2) las interacciones con las cascadas de señalización celular, 3) la organización de la cromatina en cada célula, que determina la accesibilidad de los genes para el control transcripcional, y 4) la organización de las secuencias reguladoras en la región promotora de los genes blanco.

Las proteínas correguladoras pueden clasificarse en correpresores y coactivadores, su acción juega un papel fundamental en la transactivación de los genes modulada por los receptores a hormonas esteroides. Estas proteínas permiten la integración de múltiples rutas de transducción de señales y pueden jugar un papel importante en la especificidad de los efectos hormonales, así como en la modulación de estos efectos por factores externos (McKenna *et al.*, 1999). Entre los correguladores de la acción transcripcional del RP se encuentran miembros de la familia de coactivadores de receptores a esteroides (SRC), como SRC-1 y SRC-2, ambos interactúan con la región AF-2 del dominio de unión al ligando; otro coactivador es el SRA (activador de RNA de receptores a esteroides), el cual se expresa específicamente en el cerebro e incrementa la transactivación

mediada por AF-1. Este coactivador es un transcrito de RNA (Lanz *et al.*, 1999). Entre los correpresores descritos, dos de ellos, el mediador del silenciamiento de receptores a hormonas tiroideas (SMRT) y el correpresor de receptores nucleares (NCoR), se unen preferentemente al complejo RP-antagonista e inhiben las funciones de transactivación (Wagner *et al.*, 1998; Villamar-Cruz *et al.*, 2006).

2.5 Estro postparto.

En roedores, tras la expulsión de la placenta en el parto disminuye la concentración de los estrógenos que permanecieron elevados durante el embarazo. El efecto inhibitor del E sobre la producción de prolactina deja de presentarse y se inicia la lactancia. Durante la lactancia la prolactina inhibe la secreción de GnRH y la acción de ésta sobre la hipófisis y antagoniza la acción de las gonadotropinas sobre los ovarios. Así, la ovulación se inhibe y los ovarios permanecen inactivos. Al no llevarse a cabo el ciclo estral la hembra no presenta conducta sexual durante esta etapa, que en ratas dura unos 25 a 30 días (Hardy, 1970).

En varios mamíferos se presenta un fenómeno conocido como estro postparto, un breve período de proceptividad y receptividad sexual en las primeras 24 horas después del parto. Si la hembra no queda preñada durante el estro postparto, el diestro inducido por la lactancia asegurará que la hembra no restablezca el ciclo estral (Beyer *et al.*, 2007), pero si la hembra concibe durante este período podrá gestar una nueva camada mientras cuida y amamanta a la otra (Connor y Davis, 1980a; Gilbert *et al.*, 1980; Dewsbury, 1990; Hayes, 2000; Tardif *et al.*, 2003; Mellish e Iverson, 2005; DelBarco-Trillo y Ferkin, 2006; Mayor *et al.*, 2006). No se conocen los mecanismos neuroendócrinos que regulan la transición de la nula actividad sexual de la hembra durante el embarazo a un intenso estro postparto. Los niveles de P declinan rápidamente alrededor de las 48 horas antes del parto, mientras que la producción de E se mantiene elevada hasta unas tres horas después del parto para caer drásticamente 6 horas después de éste. Connor y Davis (1980) mostraron que la conducta de estro aparece a las 6 horas después

del parto, tiene su máxima expresión entre las 9 y 12 horas y desaparece a las 20 horas posteriores al mismo.

Con respecto al fenómeno de estro postparto en otras especies de mamíferos, algunos autores han reportado niveles hormonales en suero (especialmente de E y P) durante el período postparto, los cuales se detallarán a continuación, al hablar de cada una de las especies (Mayor *et al.* 2006; Mellish e Iverson, 2005; Ziegler *et al.* 2005).

El estro postparto se ha reportado en marsupiales: en varias especies de macrópodos (canguros y wallabies) en los que, en caso de aparearse y concebir a los pocos días de dar a luz el desarrollo del nuevo embrión se detiene en el estado de blastocisto. Cuando resta un mes para que la cría abandone la bolsa, el blastocisto se implanta en el útero y reanuda su desarrollo. Muchas hembras de macrópodos pueden sostener simultáneamente a una cría lactante capaz de andar, otra en la bolsa y a un embrión en desarrollo (Muths y Hinds, 1996).

En el murciélago cabeza de martillo (*Hypsignatus monstrosus*) también se presenta el estro postparto, de manera que la hembra puede reproducirse dos veces consecutivas por año, produciendo una sola cría cada vez (Langevin y Barclay, 1990). En el pecarí de collar (*Tayassu tajacu*) se ha reportado estro postparto en un 80% de las hembras, con un 67% de éxito en la concepción en aquellos individuos que se aparean en cautiverio, esta especie muestra un pico de E al séptimo día postparto, que coincide con el inicio de las señales de estro, el cual se presenta entre los días 7 y 9 postparto; mientras que la concentración de P en sangre se incrementa más de 7 veces entre los días 3 y 11. El ciclo estral “normal” de esta especie dura entre 22 y 28 días (Mayor *et al.* 2006).

La yegua es el animal en el que el fenómeno de estro postparto es más conocido, debido a su importancia comercial. En esta especie el estro postparto se presenta en el 99% de los sujetos a los siete días postparto en promedio, con una fertilidad de aproximadamente 80% (Vivo *et al.* 1985).

En los pinípedos, como la foca gris (*Halichoerus grypus*) y la foca encapuchada (*Cystophora cristata*) también se presenta el estro postparto. Se ha reportado que las focas presentan niveles bajos de E y P durante el postparto, pero en los estudios realizados, por llevarse a cabo en campo, las muestras de suero se han colectado con intervalos de tiempo muy amplios (Mellish e Iverson, 2005).

En primates se ha reportado estro postparto en marmosetas (*Callithrix jacchus*) y tamarindos (*Saguinus oedipus*). Las marmosetas pueden aparearse y ovulan el día 10 después del parto. En esta especie la lactancia dura de 65 a 90 días (Tardif *et al.* 2003). Los tamarindos ovulan alrededor del día 19 postparto. A consecuencia de este estro postparto las hembras están preñadas la mayor parte del tiempo a partir de que alcanzan la madurez sexual (Ziegler *et al.* 2005).

También se ha reportado estro postparto en otras especies de roedores distintas de la rata, como ratones, gerbos, ratones de campo (*Microtus sp.*) y ardillas. Estos reportes están basados tanto en observaciones en vida silvestre como en cautiverio, sin embargo, dichos estudios se limitan a los aspectos etológicos del fenómeno (Haslery Banks, 1975; Carter y Witt, 1989; Prates y Guerra, 2005).

Lo anterior nos muestra que el fenómeno de estro postparto se encuentra representado en los mamíferos a lo largo de la escala filogenética, en familias cuyas estrategias de supervivencia y reproducción son sumamente distintas. Por lo tanto, este fenómeno puede tener muy diferentes funciones adaptativas según la especie en la cual se presenta.

3. Planteamiento del problema

Se desconocen los mecanismos neuroendócrinos involucrados en el despliegue de la conducta de estro postparto, por lo que en este proyecto se estudiará el papel del RP en la regulación de dicha conducta.

4. Hipótesis

1. Si la P participa en la regulación del estro postparto actuando a través del RP, se espera un incremento en el contenido de este receptor en el hipotálamo y APO previo a la expresión de la conducta de estro y a continuación una disminución en su contenido.

2. Si el RP participa en la conducta de estro postparto, la administración de un antagonista del RP, el RU486, inhibirá dicha conducta.

5. Objetivos

Objetivo general

Investigar la participación del RP en la conducta de estro postparto en la rata.

Objetivos específicos

1. Caracterizar los cambios en las concentraciones séricas de E y P durante el período de 24 horas postparto en la rata.

2. Determinar el contenido de las isoformas del RP a diferentes intervalos después del parto en el hipotálamo y el APO de la rata.

3. Explorar el papel del RP en el despliegue del estro postparto a través de la administración de la antiprogestina RU486.

6. Materiales y métodos

6.1 Animales

Se utilizaron ratas adultas de la cepa Sprague-Dawley de 230-250 g de peso mantenidas en un ciclo invertido de luz/oscuridad 14:10 horas con agua y comida *ad libitum* a 22° C de temperatura ambiente. Las hembras fueron apareadas con machos expertos bajo observación, hasta que recibieron tres eyaculaciones para asegurar la fecundación. A continuación se utilizó el método propuesto por Mayer y Rosenblatt (1998) para controlar el momento del parto, ya que éste permite obtener un lapso de tiempo uniforme para la labor de parto de un grupo de hembras que iniciaron la gestación el mismo día, facilitando el procedimiento experimental. De esta manera se logra que todas las hembras den a luz entre las 8:00 y 12:00 horas. Este método consiste en colocar a las hembras tras el apareamiento, en jaulas individuales, y el día 7 de la gestación, entre las 12:00 y las 13:00 horas se trasladan en sus mismas jaulas a otro cuarto bajo ciclo luz/oscuridad no invertido, donde permanecen hasta el parto. De esta forma, en el día 22 de la gestación las hembras comenzaron la labor de parto entre las 8:00 y 12:00 horas de la fase de luz. La eutanasia de los animales se llevó a cabo rápidamente por decapitación e inmediatamente después se obtuvieron el suero y el cerebro.

6.2. Pruebas conductuales.

Se llevaron a cabo pruebas de conducta sexual para evaluar receptividad y proceptividad en las hembras durante la etapa postparto. Las hembras se colocaron en arenas cilíndricas con paredes de Plexiglas (53 cm de diámetro x 40 cm de alto) con machos expertos. Se observó a cada una de las hembras durante 10 minutos y se registró la respuesta a los intentos de monta del macho (con o sin lordosis), así como la ocurrencia de las conductas proceptivas: saltos (hopping),

zigzagado (darting) y orejeo (ear wiggling). Se analizó la proporción de animales que realizó estas conductas en cada grupo experimental. Para evaluar la receptividad, se obtuvo el cociente de lordosis (LQ), el cual resulta de dividir el número de respuestas lordóticas entre 10 intentos de monta del macho x 100.

Para evaluar la conducta sexual durante el estro postparto se utilizaron 10 hembras intactas. En las hembras de este grupo se llevaron a cabo pruebas de conducta sexual a las 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 24 horas del nacimiento de la primera cría, momento que se consideró como la hora 0 de la etapa postparto. Las observaciones a las 3, 9 y 24 horas postparto se realizaron bajo la iluminación artificial del bioterio (etapa de luz), mientras que las observaciones a las 12, 15 y 18 horas se llevaron a cabo utilizando luz roja (30 Wt).

Para explorar el papel del RP en la conducta de estro postparto, 21 hembras (7 por grupo) fueron asignadas al azar para recibir a las 3 horas postparto, vía subcutánea, la administración de 400 µl de vehículo (aceite de maíz, 10% de etanol, 5% de benzil benzoato), 1.25 mg ó 5 mg de RU486. Posteriormente, se llevaron a cabo las pruebas de conducta sexual a las hembras tratadas, de la forma anteriormente descrita a las 3, 6, 9 y 12 horas postparto.

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante prueba de Kruskal-Wallis (KW) para determinar las diferencias en el LQ o en la expresión de conductas proceptivas entre los distintos tiempos postparto ó tratamientos utilizados y U de Mann-Whitney (U) para comparaciones entre dos grupos.

6.3. Extracción de los tejidos

Se utilizaron cuatro animales intactos por grupo sacrificados a las 3, 6, 9, 12 y 24 horas postparto, y cuatro animales administrados con vehículo ó tratados con RU 486 por grupo a las 12 h postparto. Los animales se sacrificaron por decapitación y se disecaron el APO y el hipotálamo. Estas regiones fueron procesadas inmediatamente para la extracción de proteínas totales. La sangre del tronco se colectó inmediatamente tras la decapitación, con ayuda de un embudo en un tubo

Falcon. Cada muestra se almacenó a temperatura ambiente hasta la formación del coágulo, éste se separó y el suero se sometió a centrifugación a 13500 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. El suero obtenido se congeló inmediatamente y se almacenó a -70°C . Hasta que se llevó a cabo la cuantificación de los niveles hormonales por Radioinmunoensayo.

6.4. Radioinmunoensayo

La cuantificación de E y P en el suero de los animales se realizó utilizando la técnica de radioinmunoensayo de fase sólida I^{125} con el kit ACTIVE (Diagnostic Systems Laboratories, TX, USA). La sensibilidad el ensayo fue de 7.0 pg/ml para E y de 0.1 ng/ml para P. Los coeficientes de variación intraensayo fueron de 5.2 y de 8.1 respectivamente. Los coeficientes de variación interensayo fueron de 7.9 para E y de 10.8 para P.

6.5 Extracción de Proteínas

La extracción de proteínas totales se realizó de la siguiente manera:

1. En tubos estériles se colocaron los tejidos en solución amortiguadora de lisis RIPA (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 200 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptina, 1 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinina, 1 $\mu\text{g/ml}$ Pepstatina) en una relación de 100 mg de tejido por 200 μl de solución. A continuación los tejidos se homogenizaron con Polytron, manteniendo la muestra a 4°C .
2. La muestras procesadas se transfirieron a tubos Eppendorf de 1.5 ml y se centrifugaron a 14000 rpm durante 30 minutos a 4°C , el sobrenadante se separó en alicuotas de 200 μl .

La concentración de proteínas en la muestra se determinó mediante el método de Bradford, utilizando albúmina sérica bovina para realizar la curva patrón en concentraciones de 2.5, 5, 10, 15 y 20 $\mu\text{g/ml}$.

6.6. Western blot

De cada muestra se preparó el volumen necesario para cargar 100 μg de proteína total mezclándolo con el amortiguador de carga (Tris base 50 mM, SDS 2%, β -mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0.1%, glicerol 10%) en una relación 1:1 volumen-volumen y se hirvieron a baño maría durante 5 minutos.

Se depositaron 100 μg de proteína total de cada muestra en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 7.5%. Las proteínas fueron separadas por electroforesis a 95 volts durante 3 horas. Enseguida se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 70 mA durante 2 horas en una cámara de transferencia semihúmeda. Posteriormente la membrana se bloqueó con una solución de leche descremada al 3% y BSA al 1% en TBS 1X (NaCl, Tris-Base, pH 7.4) con Tween 20 al 0.1% durante 2 horas a temperatura ambiente.

Se incubó la membrana con 5 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo primario policlonal producido en conejo anti-RP Ab-13 (Thermo Fisher Scientific, Cheshire, UK) por 24 horas a 4°C. Se realizaron tres lavados de 5 minutos con una solución de TBS+Tween 20 0.1%. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa (IgG-HRP) (NeoMarkers) en una dilución de 1:5000 durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con TBS+Tween 20 0.1% y las membranas se colocaron en TBS para continuar con la detección de proteínas, la cual se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia de alta sensibilidad (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, UK). Con este sistema el peróxido de luminol y un activador son sustratos de la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario, el cual, al reaccionar genera una señal de luminiscencia detectada en placas radiográficas.

Para corregir las posibles diferencias en la proteína cargada se utilizó α -tubulina, cuyo contenido no se modifica en el cerebro durante la etapa posparto. Para esto, se realizó un lavado de las membranas con glicina ácida (0.1M, pH 2.5) por 30 minutos a 60° C. Las membranas se incubaron toda la noche con anticuerpo primario policlonal anti-tubulina (NeoMarkers) en una dilución de 1:10000. Posteriormente se realizaron tres lavados de 5 minutos con TBS+Tween 20 0.1%. Se incubaron las membranas con anticuerpo secundario anti-ratón IgG-HRP (NeoMarkers) a una dilución de 1:5000 durante 45 minutos. Se realizaron tres lavados de 5 minutos con TBS+Tween 20 0.1%. y se detectó la proteína con el método de alta sensibilidad antes descrito.

6.7. Análisis Densitométrico y Estadístico

Cada placa fue sometida a un análisis densitométrico para cuantificar las bandas que corresponden al contenido de RP y α -tubulina mediante el programa ChemImager 4400. El nivel de expresión de cada isoforma del RP se determinó mediante la densidad de las bandas obtenidas por western blot. El valor resultante del análisis densitométrico para las bandas correspondientes a RP fue dividido entre el valor de α -tubulina a fin de normalizar los datos. El valor obtenido muestra la cantidad relativa de las isoformas del RP en cada muestra analizada, a estos valores se les consideró como contenido de RP. A los datos resultantes se les aplicó la prueba de ANOVA de una vía y la prueba *post-hoc* de Tukey, se utilizó el programa GraphPad Prism 4 para calcular los valores de probabilidad. Para analizar los datos de conducta se empleó el mismo programa para llevar a cabo las pruebas de KWs y U de Mann-Whitney (U). Se consideró que las diferencias fueron significativas cuando la p fue mayor que 0.05.

7. Resultados

7.1. Experimento 1. Análisis del comportamiento sexual de la hembra durante el postparto.

Se observaron importantes cambios en la conducta sexual durante las 24 horas posteriores al parto. A las 9 horas postparto el LQ fue de 25 y se incrementó significativamente ($F=46.37$, $p<0.001$) a las 12 LQ=93 y 15 horas postparto LQ=76. A las 18 horas postparto, la conducta de lordosis mostró una evidente disminución. (LQ= 30, $p<0.005$). Al llegar a las 24 horas postparto ninguna de las hembras desplegó conducta sexual. (Figura 5, panel A). Se observó una latencia similar en la aparición de las conductas proceptivas en la etapa postparto; a las 9 horas, 30% de las hembras mostraron alguna conducta proceptiva, mientras que a las 12 horas después del parto 90% de las hembras realizaron conductas proceptivas, y el porcentaje fue de 80 a las 15 horas. A las 18 y 24 horas el comportamiento proceptivo se redujo dramáticamente, pasando el porcentaje de hembras que realizaron alguna conducta proceptiva de 40 a 0%, respectivamente (Figura 5, panel B).

Fig. 5.

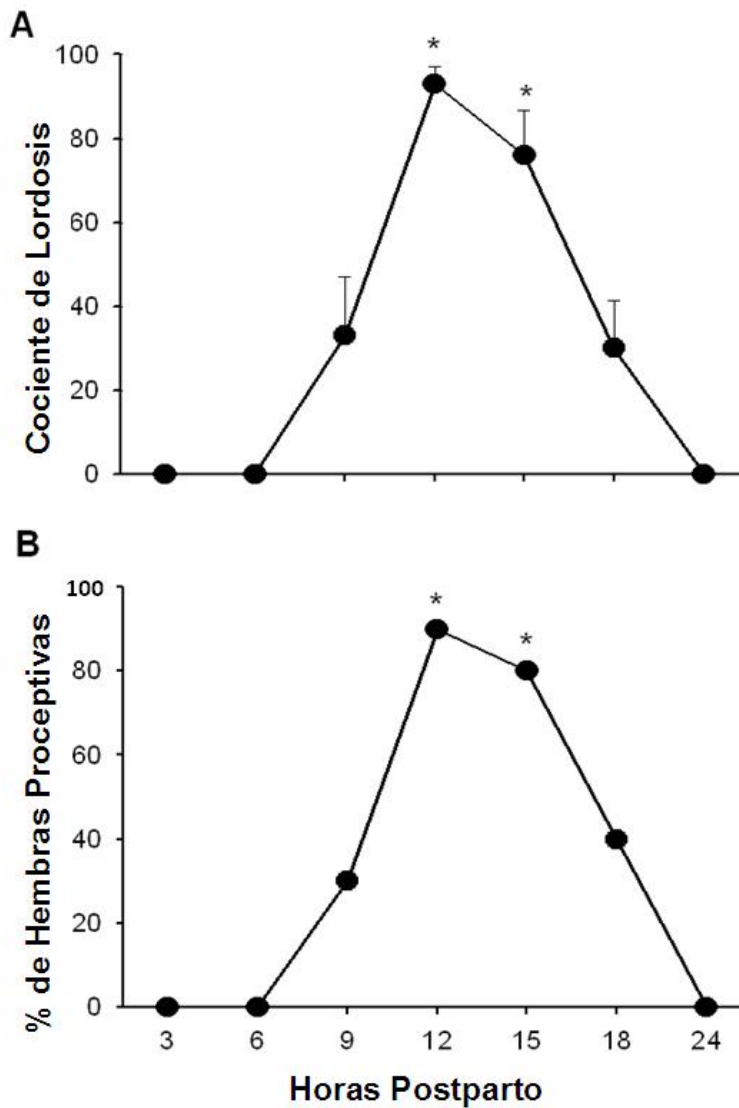


Fig. 5. Cambios en el LQ y en el porcentaje de hembras proceptivas durante el primer día postparto en ratas. * $p < 0.05$ comparado con 3,6,9,18 y 24. Los datos se expresan como la media \pm EE. $n=10$.

7.2. Experimento 2. Radioinmunoensayo para E y P.

Mediante la técnica de radioinmunoensayo se detectó un incremento en los niveles de E a las 9 horas postparto comparado con los niveles de esta hormona a

las 3, 6 y 12 horas ($F=15.48$, $p<0.05$). Los niveles más bajos de E se encontraron a las 12 horas postparto (Fig. 6 A). Las diferencias entre estos cuatro tiempos fueron significativas. Los niveles de P en suero también se incrementaron significativamente a las 9 horas postparto comparados con los niveles detectados a las 3 y 6 horas ($F=15.48$, $p<0.05$); Los niveles de P permanecieron elevados a las 12 horas y disminuyeron a las 24 horas postparto (Fig. 6 B).

Fig. 6.

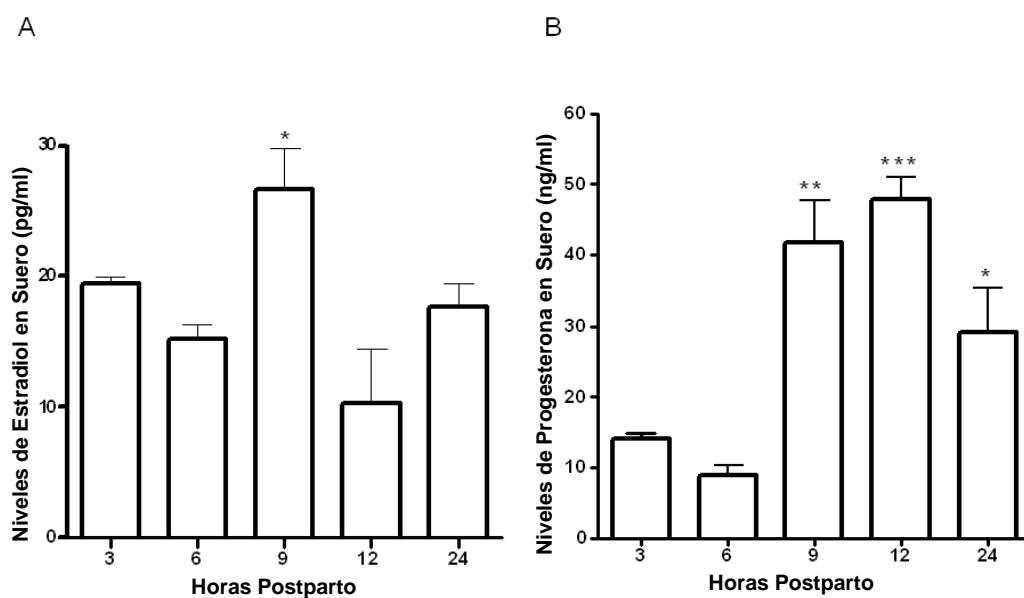


Fig. 6. Niveles de E y P en suero durante el primer día postparto. A. Niveles de E en suero (pg/ml) * $p<0.05$ comparado con 3,6 y 12 h. B. Niveles de P en suero (ng/ml). * $p<0.05$ comparado con 6h, ** $p<0.05$ comparado con 3 y 6 h, *** $p<0.05$ comparado con 3, 6 y 24 h. Los datos se expresan como la media \pm EE. $n=4$.

7.3. Experimento 3. Efecto del RU486 en el despliegue de la conducta de estro postparto.

Cómo en el experimento 1, las hembras tratadas a las que se les administró vehículo o RU486 comenzaron a desplegar la conducta de lordosis a las 9 horas (LQ=28), la respuesta máxima se registró a las 12 horas postparto (LQ=82).

Ambas dosis de RU486 tuvieron un efecto inhibitorio sobre la conducta sexual. A las 12 horas postparto, la dosis más baja (1.25 mg) redujo significativamente (61%) el LQ (KW=13.1; U=45, $p<0.05$), y la dosis más alta lo redujo en un 92% (U=51.5, $p<0.01$) (Fig. 7A). En cuanto a las conductas proceptivas, 88% de las hembras tratadas con vehículo, mostró proceptividad, mientras que sólo 42% de los animales tratados con la dosis de 1.25 mg de RU llevaron a cabo conductas proceptivas, y el porcentaje de las hembras tratadas con la dosis de 5 mg que mostraron dichas conductas fue de 14% (KW=16.3; U=45.5 vehículo vs 1.25 mg RU486; U=52 vehículo vs 5 mg RU486, $p<0.01$) (Fig. 7B).

Fig. 7. ● Veh ○ RU486 1.25 mg ▼ RU486 5 mg

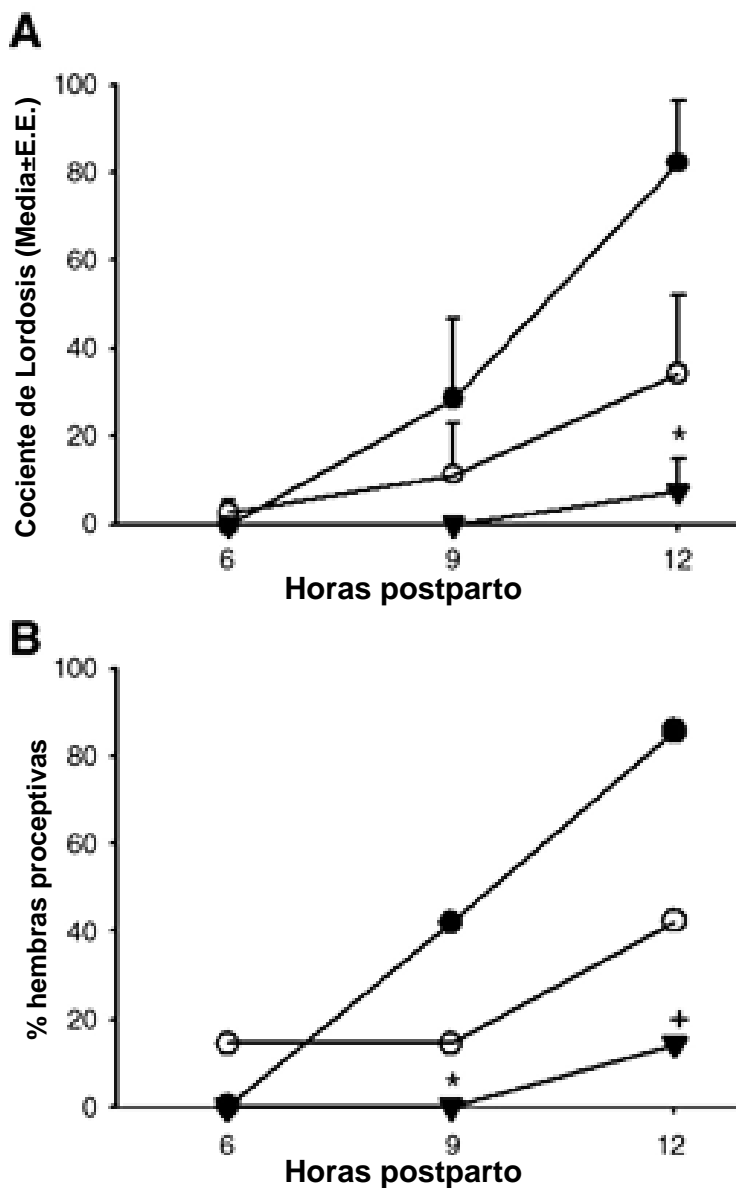


Fig. 7. Efectos del RU486 en la conducta de estro durante el período postparto en las ratas hembra. Los animales recibieron una inyección de 1.25 o 5 mg de RU486 o vehículo a las 3h postparto y se llevaron a cabo pruebas de comportamiento para cuantificar la lordosis y las conductas proceptivas. A. LQ durante el período postparto. Los datos se expresan como la media \pm EE * $p < 0.05$ vs Veh y 1.25 mg.

B. Porcentaje de las hembras que desplegaron conductas proceptivas durante el período postparto * $p < 0.05$ vs Veh, + $p < 0.05$ vs Veh y 1.25 mg. N=7.

7.4 Experimento 4. Detección de las isoformas de RP durante el periodo postparto mediante Western Blot

Tanto en el hipotálamo como en el APO de las ratas hembra a las 3,6,9,12 y 24 h postparto se detectó una banda de 80 kDa que corresponde a RP-A y dos bandas de 114 y 118 kDa que corresponden a RP-B. Se detectó el control de carga, α -tubulina como una banda de 55 kDa (Fig. 8). El análisis densitométrico muestra que en el hipotálamo el contenido de RP-A se incrementó a las 6 h postparto ($F=11.28$, $p<0.05$), disminuyó a las 9 horas y se mantuvo sin cambios significativos hasta las 24 horas postparto (Fig. 8A). En contraste no se observaron cambios significativos en el contenido de la isoforma RP-B en esta región. En el APO el contenido de RP-A también se incrementó a las 6 h postparto ($F=25$, $p<0.05$), disminuyó a las 9 h y aumentó de nuevo a las 24 horas postparto. El contenido de RP-B se incrementó a las 12 h y este incremento se mantuvo a las 24 h postparto ($F=4.54$, $p<0.05$)(Fig. 8. B). RP-A fue la isoforma predominante durante el período postparto y el contenido de RP-A en el hipotálamo fue mayor que el de RP-B durante todo el día del postparto (Fig. 9). Cabe señalar que la tasa del contenido de RP-B/RP-A se incrementó en el hipotálamo alas 9 h y en el APO a las 12 h, respectivamente ($p<0.05$) (Fig.10).

Fig. 8.

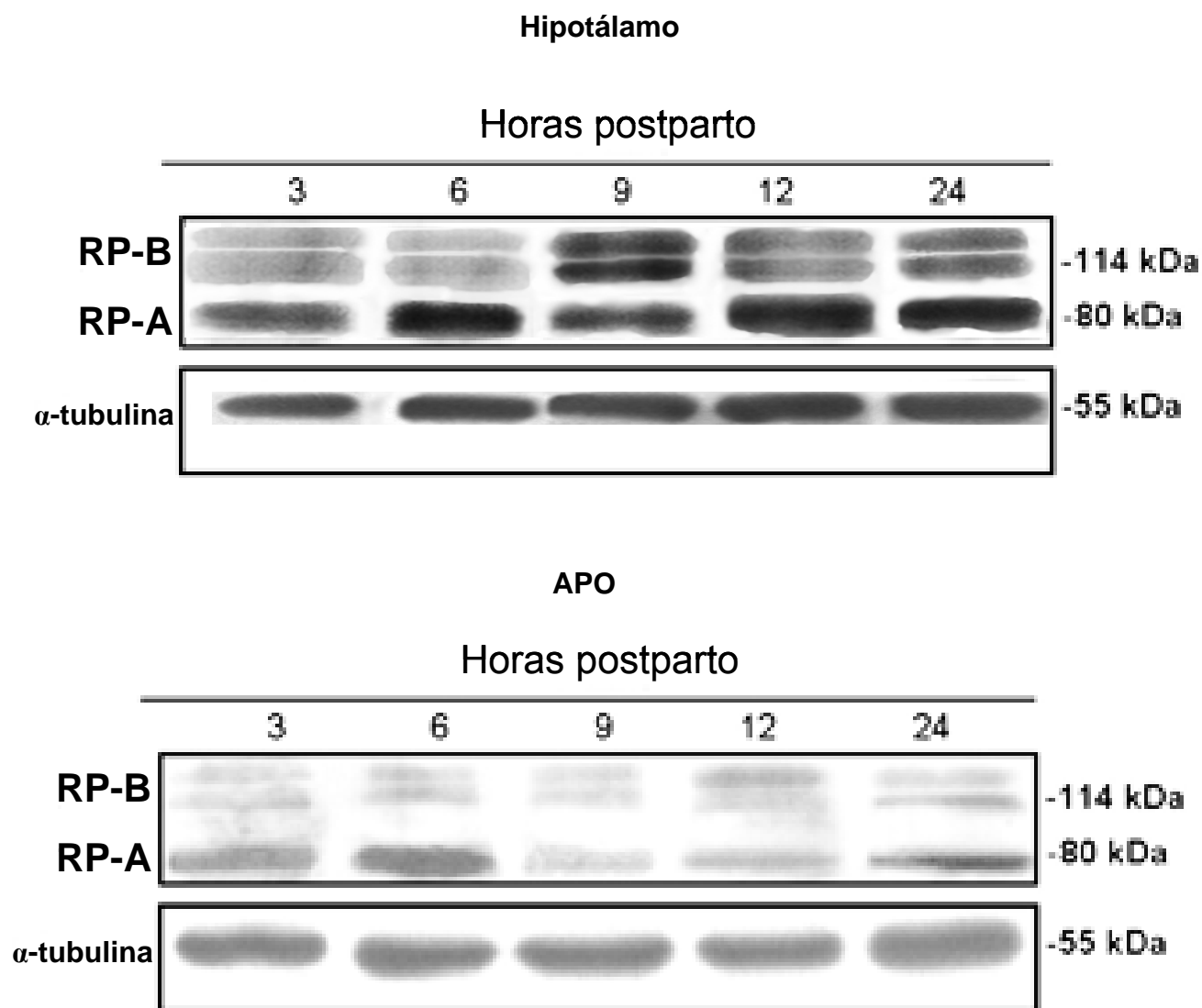


Fig. 8. Contenido de las isoformas de RP en el hipotálamo y APO durante el período postparto. Imagen de un experimento de Western Blot representativo de cada una de las áreas. Las muestras de cerebro fueron obtenidas a las 3, 6, 9, 12 y 24 h postparto. Las proteínas del hipotálamo APO (100 μ g) fueron separadas por electroforesis en gel SDS-PAGE al 7.5%. Las proteínas en el gel fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa las cuales se incubaron con un anticuerpo específico para RP, el cual reconoce ambas isoformas con la misma afinidad. El complejo RP-anticuerpo fue detectado por quimiolumiscencia (ECL). Los blots volvieron a incubarse con un anticuerpo policlonal para α -tubulina y el complejo detectado por ECL.

Fig.9.

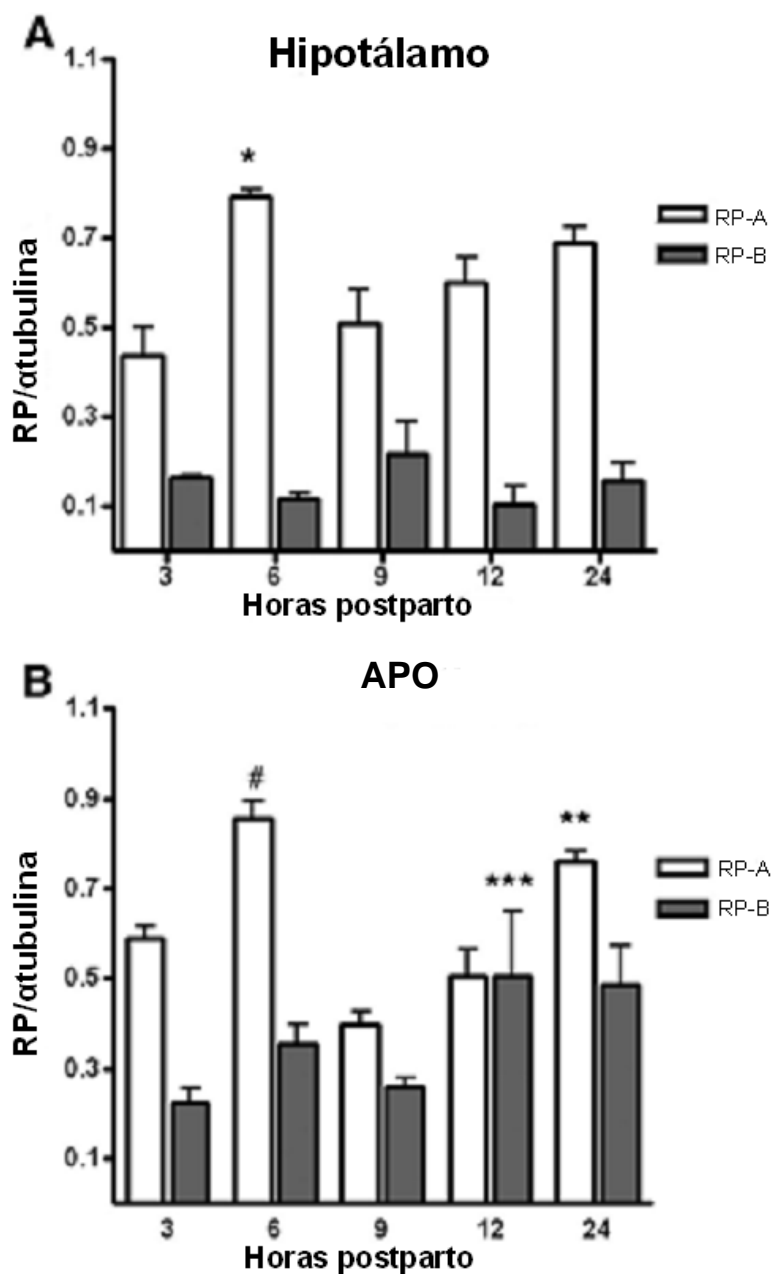


Fig. 9 Análisis densitométrico del contenido de las isoformas de RP en el hipotálamo y el APO de la rata durante el período postparto. RP-A y RP-B fueron detectadas mediante western blot en el hipotálamo (A) y el APO (B), cuantificadas por análisis densitométrico y corregidas usando los datos del contenido de α -tubulina. A. * $p < 0.05$ comparado con 3 y 9 h. B. # $p < 0.05$ comparado con 9 y 12 h, ** $p < 0.05$ comparado con 9 h, *** $p < 0.05$ comparado con 3 h: los resultados se expresan como la media \pm EE. $n = 4$.

Fig.10.

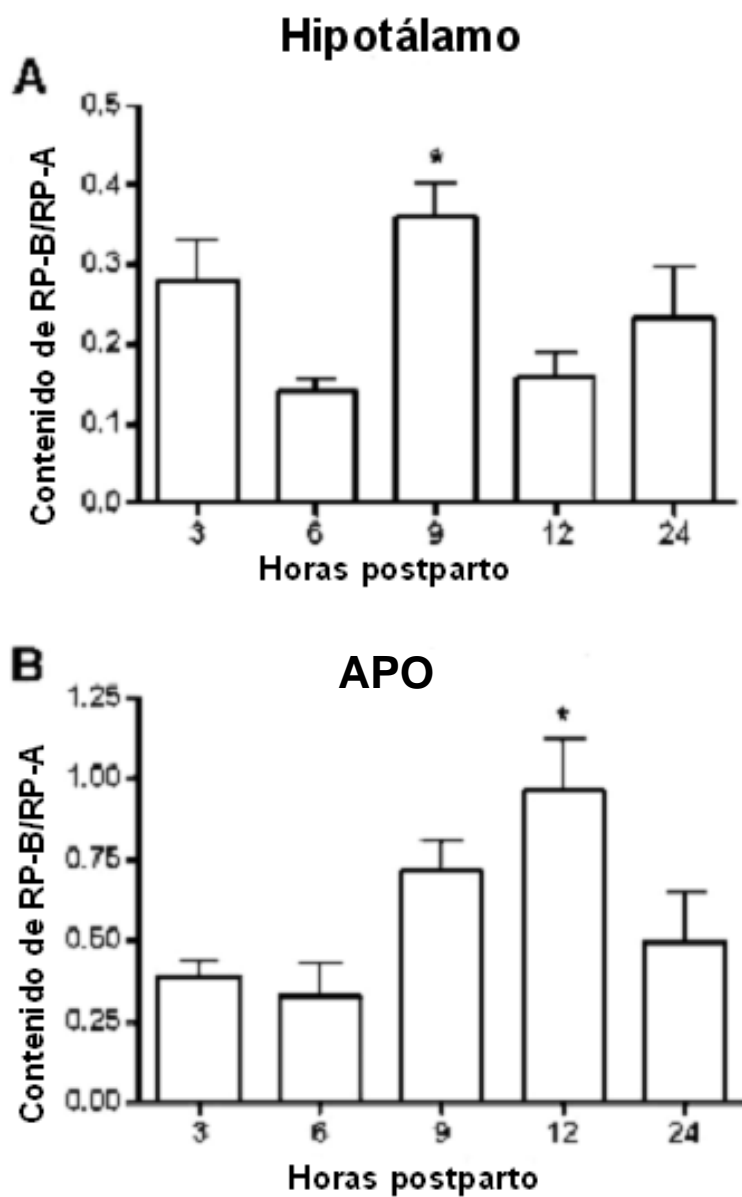


Fig. 10. Cambios en la proporción de RP-B/RP-A durante el período postparto. A. Hipotálamo. * $p < 0.05$ comparado con 6 y 12 h. B. APO. * $p < 0.05$ comparado con 3 y 6 h. Los resultados se expresan como la media \pm EE. $n=4$.

Experimento 5. Efecto de la administración de RU 486 en el contenido de las isoformas de RP en hipotálamo y APO durante el período postparto.

Mediante la técnica de Western Blot se encontró que en el hipotálamo la administración de RU486 no produjo diferencias significativas en el contenido de las isoformas de RP en comparación con las hembras a las que se les administró el vehículo (Fig. 11.), sin embargo, en el APO la administración de RU 486 produjo una disminución significativa de ambas isoformas de RP (Fig. 12) ($p < 0.05$).

Fig. 11.

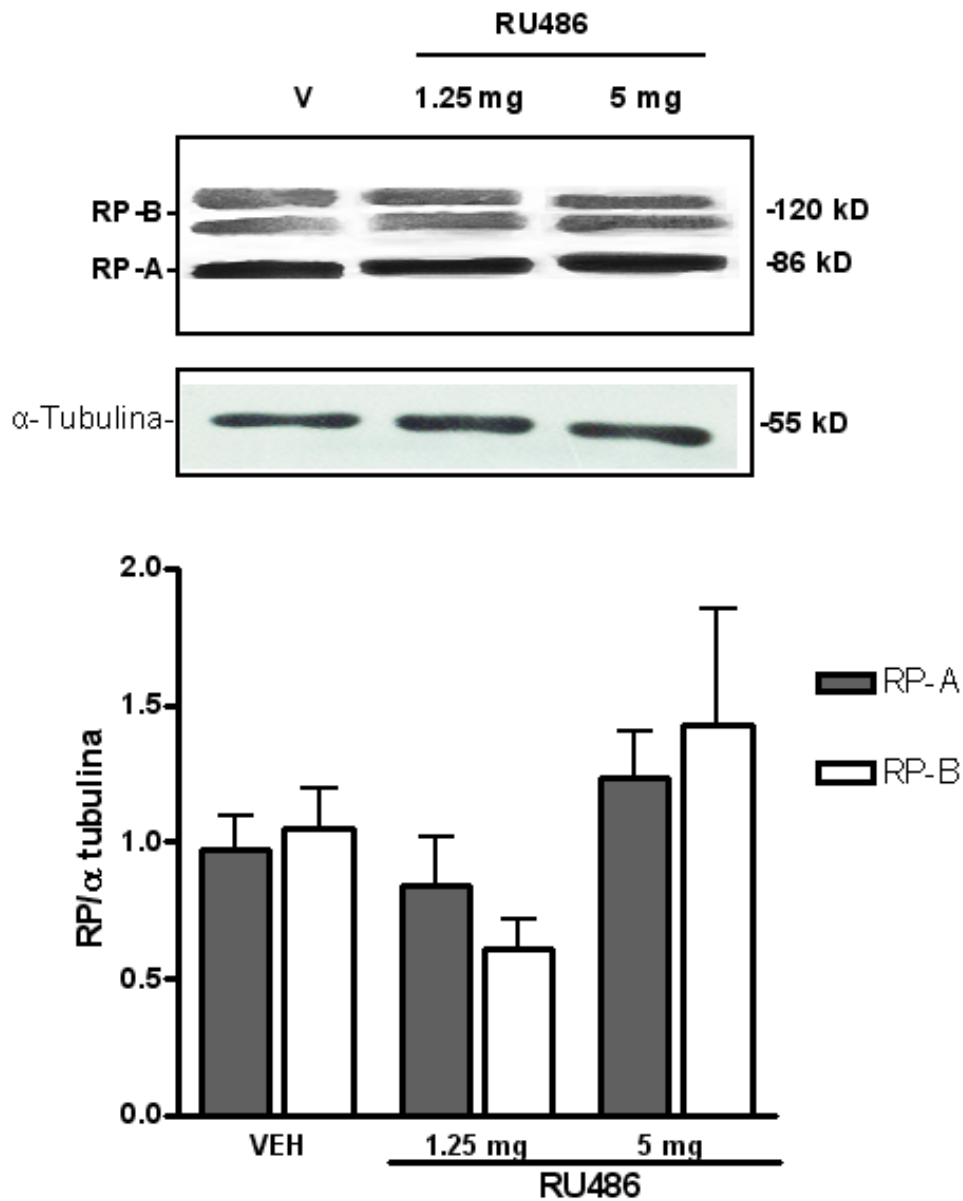


Fig. 11. Efecto de la admistración de RU486 en el contenido de las isoformas de RP en el hipotálamo a las 12 h postparto. Se las administró a los sujetos, a las 3 horas postparto 1.25 ó 5 mg de RU 486 ó vehículo. El cerebro fue extraído a las 12 h postparto. RP-A y RP-B fueron detectadas mediante western blot, cuantificadas por análisis densitométrico y corregidas usando los datos del contenido de α -tubulina. Los datos se expresan como la media \pm EE. n=4.

Fig. 12.

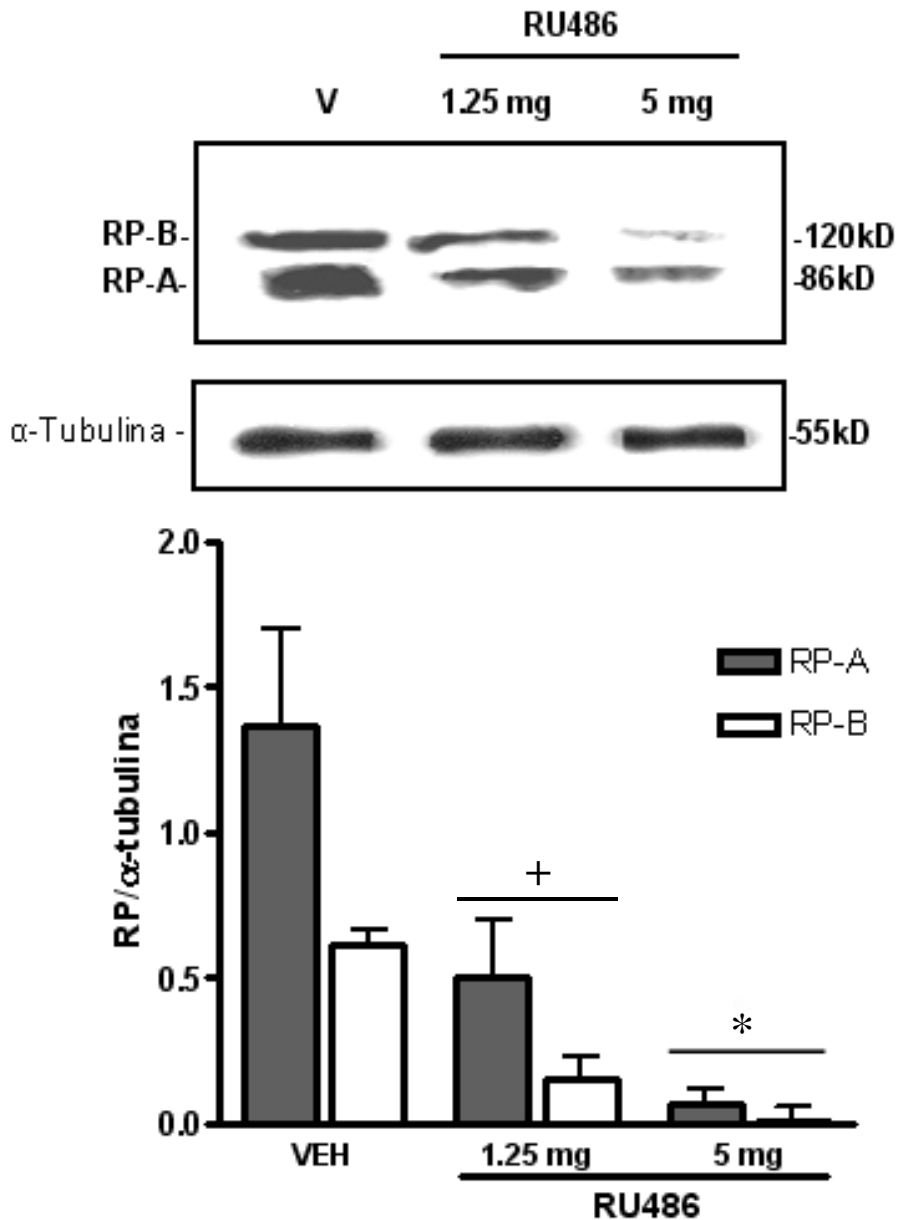


Fig. 12. Efecto de la administración de RU 486 en el contenido de las isoformas de RP en el APO a las 12 h postparto. Se las administró a los sujetos, a las 3 horas postparto 1.25 ó 5 mg de RU 486 ó vehículo. El cerebro fue extraído a las 12 h postparto. RP-A y RP-B fueron detectadas mediante western blot, cuantificadas por análisis densitométrico y corregidas usando los datos del contenido de α -tubulina. * $P < 0.05$ vs veh y 1.25 mg, + $P < 0.05$ vs veh. Los datos se expresan como la media \pm EE. $n = 4$.

Discusión

Nuestros resultados muestran que el mayor despliegue de conducta de estro (tanto lordosis como proceptividad, ocurrió a las 12 y 15 horas postparto. Esta latencia fue distinta a la reportada por Connor y Davis (1980a), dado que ellos encontraron que el 30% de las hembras desplegaban lordosis a las 6 horas postparto y el 100% de las hembras desplegaron esta conducta a las 9 horas postparto. Esta diferencia podría deberse a las cepas de ratas utilizadas, puesto que en el citado estudio se emplearon ratas de la cepa Long-Evans, mientras que en este trabajo se analizó la conducta de hembras Sprague-Dawley. La distinta latencia también podría originarse por diferencias en el método para regular el momento del parto, ya que Connor y Davis (1980) emplearon un ciclo invertido de luz/oscuridad de 12:12 horas, mientras que en este estudio se empleó el método propuesto por Mayer y Rosenblatt (1998) para controlar la duración de la gestación y el período en el que se presenta el parto, ya que este método permite obtener un tiempo uniforme de inicio para los procedimientos experimentales postparto.

El momento de inicio de la conducta sexual durante el período postparto (9h) coincidió con altos niveles de E y P en suero. Los niveles más altos de P, que se presentan a las 12 horas, concuerdan con aquellos reportados por Connor y Davis (1980b); En dicho estudio se reportó que los niveles plasmáticos de E permanecieron bajos durante todo el primer día del postparto. En contraste, en este estudio se encontró un incremento en los niveles de E en suero a las 9 horas postparto. Es posible que estas diferencias en los resultados se originen por los distintos métodos utilizados para medir los niveles hormonales: Connor y Davis determinaron los niveles de E en plasma utilizando éter de petróleo y separaron los esteroides libres y conjugados mediante carbón recubierto con Dextran.

Yoshinaga *et al.*(1969) y Yoshida *et al.*(1981) describieron que los niveles de E en plasma se incrementan repentinamente en el último día de la gestación, antes del parto, alcanzando más de 70 pg/ml al inicio del trabajo de parto; Puri y Garfield

(1982) también encontraron niveles altos de E (1.5 ng/g) durante el parto en muestras de tejido uterino.

Durante el ciclo estral normal en las ratas, los niveles de E decrecen antes de la ovulación, al inicio del período de conducta sexual (estro conductual) durante la noche del proestro. En este estudio observamos que a las 9 horas postparto los niveles de E fueron de 27 pg/ml, semejantes a los alcanzados en las primeras horas del día del proestro. Es posible que el E provenga de las células de la teca del folículo maduro antes de la ruptura, tal como ocurre durante el ciclo estral normal. La ovulación postparto se presenta entre las 15 y 18 horas después del parto (Ying *et al.*, 1973; Freeman, 1988; Takiguchi *et al.*, 2004).

El incremento en los niveles de E en plasma estimula la liberación hipotalámica de la GNRH, la cual provoca el incremento de LH por la hipófisis que promueve la ovulación (Freeman, 1988).

No está claro el origen de la secreción de P previa al despliegue del estro postparto (ya sea al as 9 o 12 horas). Long y Evans (1922) observaron que los ovarios de las ratas lactantes contenían dos conjuntos de cuerpos lúteos; uno que permanece desde la gestación y otro resultado de la ovulación postparto. Durante la gestación, el cuerpo lúteo no sufre luteólisis estructural, y su contribución a la secreción ovárica de P podría estar involucrada en la expresión del estro postparto. El mecanismo celular involucrado en el despliegue del comportamiento de estro durante el primer día del postparto ha sido mucho menos estudiado que durante el ciclo estral normal. Estudios previos han mostrado que durante el ciclo estral normal, así como en ratas pretratadas con E, el inicio de las conductas receptivas precede a las proceptivas por aproximadamente dos horas (Hlinak y Madlafousek, 1978; Glaser *et al.*, 1983; Fadem *et al.*, 1979; Tennent *et al.*, 1980). Rubin y Barfield (1983) estudiaron el curso temporal de la conducta de estro inducida por P y ellos encontraron que la administración de P incrementó el LQ entre 1 y 2 horas después, pero el comportamiento proceptivo no se incrementó sino hasta entre 2 y 4 horas después de la administración. En cambio, nuestros resultados muestran que durante el período postparto la aparición de ambos

comportamientos tiene la misma latencia, comenzando a las 9 horas y decreciendo a las 18 horas tras el parto.

Durante este período la hembra enfrenta un conflicto entre demandas simultáneas: la del cuidado que requieren su camada y la del interés de aparearse con el macho (Gilbert et al., 1980; Agrati et al., 2008). Así, las hembras deben unir la presencia de las conductas que motivan la aproximación del macho (como zigzageo, brincoteo y orejeo), y el despliegue de intensa lordosis, a fin de mejorar la eficiencia de este comportamiento en el período de estro postparto, durante el cual debe repartir su tiempo entre el macho y la camada. Hedricks y McClintock (1985) encontraron que en las ratas Sprague-Dawley la cópula postparto fue más rápida que la que se presenta durante el estro cíclico, debido a que los intervalos entre intromisiones son más cortos durante el estro postparto y la hembra resulta más atractiva para el macho. La presencia de la camada no determina un apareamiento más veloz, sino que las hembras dividen el tiempo entre el apareamiento y sus tareas maternas, dirigiéndose a donde está el macho para llevar a cabo el apareamiento y volviendo con las crías. Estas observaciones sugieren que las condiciones hormonales que conducen al estro difieren entre las ratas que se encuentran en el ciclo estral normal y aquellas que se encuentran en el postparto. De hecho el incremento en los niveles hormonales que provoca la ovulación en el postparto, no se evita mediante administración de barbitúricos, como ocurre en las ratas en estro cíclico, a menos que la administración se de inmediatamente tras el parto. Estos hallazgos condujeron a Fox y Smith (1984) a sugerir que la señal para el incremento en la secreción de gonadotropinas, y posiblemente para la conducta de estro se activa mediante estimulación vagino-cervical durante el parto.

Los estudios farmacológicos han mostrado que se requieren entre 16 y 18 horas entre el pretratamiento con E y la administración de P para que se produzca la conducta de estro. Por lo tanto es poco probable que el incremento de E durante el postparto sea el causante del estro en esta etapa. Es posible que sea más bien complementario al efecto de E secretado durante el último día de la gestación. Por otra parte, en las ratas pretratadas con estrógenos, la latencia con la que la P

estimula la lordosis es breve, el efecto máximo ocurre alrededor de las 4 horas tras la administración de P. El hallazgo de los valores más elevados de P a las 6 y 9 horas postparto es consistente con la idea de que la P facilita la conducta de estro durante el postparto.

Nuestros resultados muestran que el RP es esencial durante el postparto, ya que la administración de su antagonista, RU486, 3 horas tras el parto bloqueó efectivamente la conducta sexual (receptiva y proceptiva). Muchos estudios apoyan la participación del RP en el mecanismo por el cual la P facilita la conducta de estro (Blaustein y Feder, 1979; González-Flores *et al.*, 2004, Pfaff *et al.*, 2006), principalmente en el HVM (Camacho-Arroyo *et al.*, 1996). Por ejemplo, el RU486 inhibe la lordosis facilitada por P en la rata (González-Mariscal *et al.*, 1989; Barbosa-Vargas *et al.*, 2009); la infusión intracerebral de oligonucleótidos antisentido para el RP también bloquea la lordosis inducida por P (Guerra-Araiza *et al.*, 2009) y los ratones hembra knockout para el gen del RP no despliegan conducta sexual cuando se les administra P (Lydon *et al.*, 1995).

El tratamiento con E incrementa el contenido de RP en el HVM y el APO de la rata (Dufourny y Warenbourg, 1996; Guerra-Araiza *et al.*, 2003). Los picos de E encontrados a las 3 y 9 horas postparto podrían estar relacionados con el alto contenido de RP observado a las 6 horas y de las 9 a las 24 horas, si bien el alto contenido de RP-A a las 6 horas postparto podría reflejar los efectos de los altos niveles de E en suero antes del parto, los cuales han sido reportados por Shaikh (1971), Puri y Garfield (1982), Yoshida *et al.* (1981), y Elenkov *et al.* (2001).

Parsons *et al.* (1981) encontraron que el tiempo mínimo para la activación del reflejo de lordosis por E es de una hora. Este efecto se asocia con un incremento en la expresión de RP en el hipotálamo mediobasal y el área preóptica de la rata.

En el cerebro de la rata el RP se expresa como dos isoformas: una completa de cerca de 110 kDa, (RP-B) y una forma truncada en la región N-terminal, de cerca de 80kDa (RP-A) con funciones distintas, aunque ambas isoformas provienen de un mismo gen (Camacho-Arroyo *et al.*, 2007). Los resultados de este trabajo muestran que la isoforma predominante de RP en el hipotálamo y el APO durante el postparto es RP-A. Las investigaciones con cepas de ratones que no expresan

ya sea RP-A o RP-B han hecho evidente que RP-A es esencial para la facilitación de la conducta sexual por P. La isoforma RP-B también participa en el despliegue de la lordosis, sin embargo su presencia no es esencial para que ésta se lleve a cabo en el ratón (Mani *et al.*, 2006). Un estudio con oligonucleótidos antisentido llevado a cabo por nuestro grupo de investigación, muestra que la isoforma RP-B es esencial para el despliegue de la conducta de lordosis en las ratas hembras pretratadas con E y P (Guerra-Araiza *et al.*, 2009). Según nuestros resultados, la expresión más alta de RP-B se presenta durante el despliegue de la conducta de lordosis a las 9 horas postparto en el hipotálamo y a las 12 horas en el APO. En general, RP-B tiene mayor actividad transcripcional que RP-A (Vegeto *et al.*, 1993). En contraste, RP-A es un represor de la actividad transcripcional mediada por RP-B, lo cual nos lleva a pensar que RP-A podría disminuir el efecto biológico de la P en ciertos tejidos y condiciones fisiológicas específicas, como al final de la gestación y durante la labor de parto en los humanos (Vegeto *et al.*, 1993; Pieber *et al.*, 2001; Mesiano *et al.*, 2002).

De esta forma, se puede concluir que los efectos de la P dependen de la proporción de RP-A/RP-B. Así, los cambios en la tasa RP-A/RP-B podrían reflejar distinta contribución de cada isoforma en la regulación de la conducta de estro postparto. Es posible suponer que el efecto represor de RP-A puede disminuir la excitabilidad del APO, la cual inhibe en forma tónica redes neurales en el sistema nervioso periférico (Powers, 1971; Powers y Valenstein, 1972) durante las primeras horas postparto, favoreciendo la expresión de la conducta de estro (lordosis y proceptividad). Este efecto podría verse reforzado por los efectos activadores de RP-B en el hipotálamo, área en que la expresión de RP-B se incrementa a las 9 horas postparto. Es posible que la expresión diferencial de las isoformas del RP en el hipotálamo y el APO contribuyan al despliegue de la conducta de estro tanto durante el ciclo estral como en el postparto.

El tratamiento con RU486 tuvo un efecto completamente distinto sobre la expresión del RP en cada una de las áreas cerebrales estudiadas, mientras en el APO redujo el contenido de ambas isoformas de forma evidente y consistente. En el hipotálamo no se observó ningún cambio significativo en el contenido de

ninguna de las dos isoformas. El mecanismo de acción por el cual el RU486 antagoniza la acción de las progestinas consiste en su unión al RP, permitiendo que éste forme dímeros y se una al ERH en el DNA, pero impide que active la transcripción (Cadepond *et al.*, 1997).

Al unirse al RP, es posible que el RU486 fosforile el RP y lo marque para su degradación, aún si no ha activado la transcripción de los genes blanco. Existen estudios en los cuales se reporta una acción semejante del RU486, disminuyendo la expresión de RP a nivel de la proteína en otros tejidos, tales como útero y ovario (Fang *et al.*, 1997; Shao *et al.*, 2003) o bien del mRNA de RP (Tseng y Zhu, 1997). El que existan estudios en los que se reporta que la administración de RU486 no tiene efecto en el contenido de RP, o bien, que el tratamiento con RU486 incrementa el contenido de las isoformas de RP (Shao *et al.*, 2006) confirma que la acción de esta antiprogestina es tejido-específica. Es llamativo que incluso se presenten diferencias entre dos áreas del SNC; las causas de esta especificidad pueden deberse a las interacciones del RP con coactivadores y corepresores, los cuales presentan variaciones tejido específicas. Este hallazgo plantea preguntas sobre la interacción del RP con otros elementos de las rutas de señalización celular, y cómo éstos pueden afectar la acción de las antiprogestinas. El RU486 puede llegar a comportarse como agonista, en su interacción con RP y receptores membranales a esteroides, en esto interviene la interacción con otras vías de señalización (Cadepond *et al.*, 1997).

Conclusiones

- El RP tiene una función crítica en la regulación de la conducta de estro durante el período postparto en la rata.
- En el hipotálamo y APO la isoforma RP-A es predominante durante el período postparto.
- Hay cambios significativos en el contenido de ambas isoformas de RP en el Hipotálamo y APO durante el período postparto
- La acción de la antiprogestina RU486 sobre la expresión del RP es tejido-específica.

Bibliografía

Agrati, D., Fernandez-Guasti, A., Ferreira, A. (2008). The reproductive stage and experience of sexually receptive mothers alter their preference for pups or males. *Behav Neurosci* 122, 998-1004.

Allen, L.G., Wilson, F.J., and Macdonald, G.J. (1989). Neuropeptide Y-containing nerves in rat gonads: sex difference and development. *Biol Reprod* 40, 371-378.

Bai, W., Weigel, N.L. (1995). Phosphorylation and steroid hormone action. *Vitam Horm* 51, 289-313.

Barbosa-Vargas, E., Pfaus, J.G., and Woodside, B. (2009). Sexual behavior in lactating rats: role of estrogen-induced progesterone receptors. *Horm Behav* 56, 246-253.

Barfield, M.A., and Lisk, R.D. (1974). Relative contributions of ovarian and adrenal progesterone to the timing of heat in the 4-day cyclic rat. *Endocrinology* 94, 571-575.

Baskerville, T., Douglas, A.J. (2008). Interactions between dopamine and oxytocin in the control of sexual behaviour. *Prog Brain Res* 170, 277-290.

Beach, F.A. (1976). Sexual attractivity, proceptivity, and receptivity in female mammals. *Horm Behav* 7, 105-138.

Beato, M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56, 335-344.

Beato, M., and Klug, J. (2000). Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 6, 225-236.

Beck, C.A., Weigel, N.L., and Edwards, D.P. (1992). Effects of hormone and cellular modulators of protein phosphorylation on transcriptional activity, DNA binding, and phosphorylation of human progesterone receptors. *Mol Endocrinol* 6, 607-620.

Bergland, R.M., and Page, R.B. (1979). Pituitary-brain vascular relations: a new paradigm. *Science* 204, 18-24.

Beyer, C., Hoffman, K.L., and Gonzalez-Flores, O. (2007). Neuroendocrine regulation of estrous behavior in the rabbit: similarities and differences with the rat. *Horm Behav* 52, 2-11.

Blaustein, J.D. (2008). Neuroendocrine regulation of feminine sexual behavior: lessons from rodent models and thoughts about humans. *Annu Rev Psychol* 59, 93-118.

Blaustein, J.D., Erskine, M.S., (2002). Feminine sexual behavior: cellular integration of hormonal and afferent information in the rodent forebrain. In *Hormones, Brain and Behavior*, D.W. Pfaff, Arnold, A. P., Etgen, A.M., Fahrbach, S.E., Rubin, R.T., ed. (New York, Academic Press), pp. 139-214.

Blaustein, J.D., Feder, H.H., (1979). Cytoplasmic progestin-receptors in guinea pig brain: characteristics and relationship to the induction of sexual behavior. . *Brain Res* 169, 481-497.

Brown, T.J., and Blaustein, J.D. (1984). Supplemental progesterone delays heat termination and the loss of progestin receptors from hypothalamic cell nuclei in female guinea pigs. *Neuroendocrinology* 39, 384-391.

Cadepond, F., Ulmann, A., and Baulieu, E.E. (1997). RU486 (mifepristone): mechanisms of action and clinical uses. *Annu Rev Med* 48, 129-156.

Calizo, L.H., and Flanagan-Cato, L.M. (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.

Camacho-Arroyo, I. (2003). Progesterone Receptor Isoforms in Brain. In *Recent Research Developments in Life Sciences*, A. Gayathri, ed. (Kerala, Research Signpost), pp. 221-242.

Camacho-Arroyo, I., Gonzalez-Arenas, A., Gonzalez-Aguero, G., Guerra-Araiza, C., and Gonzalez-Moran, G. (2003). Changes in the content of progesterone receptor isoforms and estrogen receptor alpha in the chick brain during embryonic development. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 136, 447-452.

Camacho-Arroyo, I., Gonzalez-Arenas, A., and Gonzalez-Moran, G. (2007). Ontogenic variations in the content and distribution of progesterone receptor isoforms in the reproductive tract and brain of chicks. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 146, 644-652.

Camacho-Arroyo, I., Guerra-Araiza, C., and Cerbon, M.A. (1998). Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *Neuroreport* 9, 3993-3996.

Camacho-Arroyo I, H.-M.V., Rivas-Suárez M, Guerra-Araiza C, González-Morán MG. (2007). Changes in progesterone receptor isoforms content in the brain of immature, mature and aged male and female chickens. . *Gen Comp Endocrinol* 150, 381-385.

Camacho-Arroyo, I., Neri-Gomez, T., Gonzalez-Arenas, A., and Guerra-Araiza, C. (2005). Changes in the content of steroid receptor coactivator-1 and silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors in the rat brain during the estrous cycle. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94, 267-272.

Camacho-Arroyo I, P.-P.G., Pasapera AM, Cerbón MA. (1994a). Intracellular progesterone receptors are differentially regulated by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. . *J Steroid Biochem Mol Biol* 50, 299-303.

Camacho-Arroyo, I., Pasapera, A.M., and Cerbon, M.A. (1996). Regulation of progesterone receptor gene expression by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *Neurosci Lett* 214, 25-28.

Camacho-Arroyo I, R.A., Gamboa-Domínguez A, Pérez-Palacios G, Cerbón MA. (1994b). Immunohistochemical localization of intracellular progesterone and glucocorticoid receptors in the rabbit lung. *J Endocrinol* 142, 311-316.

Camacho-Arroyo, I., Rodríguez-Dorantes, M. (2006). Transcriptional activity regulated by progesterone receptor isoforms. In *Molecular Endocrinology*, P. Joseph-Bravo, ed. (Kerala, Research Signpost), pp. 25-38.

Camacho-Arroyo, I., Villamar-Cruz, O., Gonzalez-Arenas, A., and Guerra-Araiza, C. (2002). Participation of the 26S proteasome in the regulation of progesterone receptor concentrations in the rat brain. *Neuroendocrinology* 76, 267-271.

Carrive, P., Morgan, M.M. (2004). Periaqueductal gray. In *The human nervous system*, G. Paxinos, Mai, J.K., ed. (Amsterdam, Elsevier), pp. 393-432.

Carter, C.S. (1992). Oxytocin and sexual behavior. . *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 16, 131-144.

Carter, C.S., Witt, D.M., Manock, S.R., Adams, K.A., Bahr, J.M., and Carlstead, K. (1989). Hormonal correlates of sexual behavior and ovulation in male-induced and postpartum estrus in female prairie voles. *Physiol Behav* 46, 941-948.

Clemm DL, M.B., Santiso-Mere D, McDonnell DP. (1995). Definition of the critical cellular components which distinguish between hormone and antihormone activated progesterone receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53, 487-495.

Connor, J.R., and Davis, H.N. (1980a). Postpartum estrus in Norway rats. I. Behavior. *Biol Reprod* 23, 994-999.

Connor, J.R., and Davis, H.N. (1980b). Postpartum estrus in Norway rats. II. Physiology. *Biol Reprod* 23, 1000-1006.

Christensen K, E.P., Oñate SA, Beck CA, DeMarzo A, Altmann M, Lieberman BA, St John J, Nordeen SK, Edwards DP. (1991). Characterization and functional properties of the A and B forms of human progesterone receptors synthesized in a baculovirus system. *Mol Endocrinol* 5, 1755-1770.

Daniels, D., and Flanagan-Cato, L.M. (2000). Functionally-defined compartments of the lordosis neural circuit in the ventromedial hypothalamus in female rats. *J Neurobiol* 45, 1-13.

del Barco-Trillo, J., and Ferkin, M.H. (2006). Similarities between female meadow voles mating during post-partum oestrus and raising two concurrent litters and females raising only one litter. *Reprod Fertil Dev* 18, 751-756.

Dewsbury, D.A. (1990). Modes of estrus induction as a factor in studies of the reproductive behavior of rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 14, 147-155.

Dohanich, G.P., and Clemens, L.G. (1981). Brain areas implicated in cholinergic regulation of sexual behavior. *Horm Behav* 15, 157-167.

Dudley, C., Jamison, T.S., Moss, R.L. (1982). Inhibition of lordosis behavior in the female rat by intraventricular infusion of prolactin and by chronic hyperprolactinemia. *Endocrinology* 110, 677-679.

Dufourny, L., and Warembourg, M. (1996). Colocalization of progesterone receptor and somatostatin immunoreactivities in the hypothalamus of the male and female guinea pig. *Neuroendocrinology* 64, 215-224.

Elenkov, I.J., Wilder, R.L., Bakalov, V.K., Link, A.A., Dimitrov, M.A., Fisher, S., Crane, M., Kanik, K.S., and Chrousos, G.P. (2001). IL-12, TNF-alpha, and hormonal changes during late pregnancy and early postpartum: implications for autoimmune disease activity during these times. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 4933-4938.

Etgen, A.M., and Barfield, R.J. (1986). Antagonism of female sexual behavior with intracerebral implants of antiprogestin RU 38486: correlation with binding to neural progestin receptors. *Endocrinology* 119, 1610-1617.

Etgen, A.M., Chu, H.P., Fiber, J.M., Karkanias, G.B., and Morales, J.M. (1999). Hormonal integration of neurochemical and sensory signals governing female reproductive behavior. *Behav Brain Res* 105, 93-103.

Everett, J.W. (1989). Neurobiology of reproduction in the female rat. A fifty-year perspective. *Monogr Endocrinol* 32, 1-133.

Fadem, B.H., Barfield, R.J., and Whalen, R.E. (1979). Dose-response and time-response relationships between progesterone and the display of patterns of receptive and proceptive behavior in the female rat. *Horm Behav* 13, 40-48.

Fang, X., Wong, S., and Mitchell, B.F. (1997). Effects of RU486 on estrogen, progesterone, oxytocin, and their receptors in the rat uterus during late gestation. *Endocrinology* 138, 2763-2768.

Fox, S.R., and Smith, M.S. (1984). Postpartum preovulatory surge of gonadotropin secretion in the rat may be initiated by the labor process. *Biol Reprod* 31, 619-626.

Freeman, M. (1988). The ovarian Cycle of the rat. In *The Physiology of Reproduction*, E. Knobil, Neill, J, ed. (New York, Raven Press Ltd).

Frye, C.A., and Walf, A.A. (2008). Activity of protein kinase C is important for 3alpha,5alpha-THP's actions at dopamine type 1-like and/or GABAA receptors in the ventral tegmental area for lordosis of rats. *Brain Res Bull* 77, 91-97.

García-Horsman, P., Paredes, R (2004). ¿Es la cópula siempre placentera para la hembra? In *Temas selectos de neurociencias III*, J. Velázquez-Moctezuma, ed. (México D.F., UAM), p. 283.

Gasc, J., Delahaye, F., Baulieu, EE. (1989). Compared intracellular localization of the glucocorticoid and progesterone receptors: An immunocytochemical study. *Exp Cell Res*, 492-504.

Giangrande, P., Pollio, G., McDonnell, DP. (1997). Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. *J Biol Chem* 272, 32889-32900.

Giangrande, P.H., and McDonnell, D.P. (1999). The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent Prog Horm Res* 54, 291-313; discussion 313-294.

Gilbert, A.N., Pelchat, J.R., Adler, T., (1980). Postpartum copulatory and maternal behaviour in Norway rats under seminatural conditions. *Anim Behav* 28, 989-995.

Glaser, J.H., Rubin, B.S., and Barfield, R.J. (1983). Onset of the receptive and proceptive components of feminine sexual behavior in rats following the intravenous administration of progesterone. *Horm Behav* 17, 18-27.

Gomora-Arrati, P., Beyer, C., Lima-Hernandez, F.J., Gracia, M.E., Etgen, A.M., and Gonzalez-Flores, O. (2008). GnRH mediates estrous behavior induced by ring A reduced progestins and vaginocervical stimulation. *Behav Brain Res* 187, 1-8.

Gonzalez-Flores, O., Guerra-Araiza, C., Cerbon, M., Camacho-Arroyo, I., and Etgen, A.M. (2004). The 26S proteasome participates in the sequential inhibition of estrous behavior induced by progesterone in rats. *Endocrinology* 145, 2328-2336.

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

González-Mariscal, G., González-Flores, O. (2002). In *Motivación y conducta: sus bases biológicas*, C. Escobar Briones, Aguilar Robledo, R.A. , ed. (México, DF., Manual Moderno.), pp. 277-298.

Gonzalez-Moran, G., and Camacho-Arroyo, I. (1998). Histomorphometric and progesterone receptor immunohistochemical analysis in the oviduct of newly hatched chicks treated with follicle-stimulating hormone during embryonic development. *Anat Histol Embryol* 27, 277-282.

Gonzalez-Moran, G., and Camacho-Arroyo, I. (2001). Immunohistochemical localization of progesterone receptor isoforms in the chick pre-follicular ovary. *Anat Histol Embryol* 30, 153-158.

Graham, J., Roman, SD., McGowan, E., Sutherland, RL., Clarke, CL. (1995). Preferential stimulation of human progesterone receptor B expression by estrogen in T-47D human breast cancer cells. *J Biol Chem* 270, 30693-30700.

Green, I.C., Howell, S.L., El Seifi, S., and Perrin, D. (1978). Binding of 3H-progesterone by isolated rat islets of Langerhans. *Diabetologia* 15, 349-355.

Guerra-Araiza, C., and Camacho-Arroyo, I. (2000). Las isoformas del receptor a progesterona. *Función y regulación*. *Rev Invest Clin* 52, 686-691.

Guerra-Araiza, C., Coyoy-Salgado, A., and Camacho-Arroyo, I. (2002). Sex differences in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in the rat brain. *Brain Res Bull* 59, 105-109.

Guerra-Araiza, C., Gomora-Arrati, P., Garcia-Juarez, M., Armengual-Villegas, A., Miranda-Martinez, A., Lima-Hernandez, F.J., Camacho-Arroyo, I., and Gonzalez-Flores, O. (2009). Role of progesterone receptor isoforms in female sexual behavior induced by progestins in rats. *Neuroendocrinology* 90, 73-81.

Guerra-Araiza, C., Reyna-Neyra, A., Salazar, A.M., Cerbon, M.A., Morimoto, S., and Camacho-Arroyo, I. (2001). Progesterone receptor isoforms expression in the pubertal and adult male rat brain. *Brain Res Bull* 54, 13-17.

Guerra-Araiza, C., Villamar-Cruz, O., Gonzalez-Arenas, A., Chavira, R., and Camacho-Arroyo, I. (2003). Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after oestradiol and progesterone treatments. *J Neuroendocrinol* 15, 984-990.

Guillemin, R. (1978). Control of adenohipophysial functions by peptides of the central nervous system. *Harvey Lect* 71, 71-131.

Guiochon-Mantel, A., Loosfelt, H., Lescop, P., Sar, S., Atger, M., Perrot-Appianat, M., and Milgrom, E. (1989). Mechanisms of nuclear localization of the progesterone receptor: evidence for interaction between monomers. *Cell* 57, 1147-1154.

Gunnert, J.W., Granger, K., Cryan, E., and Demarest, K.T. (1999). Characterization of the progestin receptors in the human TE85 and murine MC3T3-E1 osteoblast-like cell lines. *J Endocrinol* 163, 139-147.

Halász, B. (2000). The hypothalamus as an endocrine organ. In *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*, P.M. Conn, Freeman, M.E., ed. (Totowa, NJ, Humana Press).

Hall, W.C. (2001). The visceral motor system. In *Neuroscience*, D. Purves, Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A-S., McNamara, J.O., Williams, S.M., ed. (Sunderland, MA, Sinauer Associates), pp. 469-500.

Hardy, D.F. (1970). The effect of constant light on the estrous cycle and behaviour of the female rat. *Physiol Behav* 5, 421-425.

Hasler, J.F., and Banks, E.M. (1975a). Morphological changes in the ovaries and other organs of the collared lemming (*Dicrostonyx groenlandicus*) during pregnancy and pseudopregnancy. *Can J Zool* 53, 12-18.

Hasler, J.F., and Banks, E.M. (1975b). Reproductive performance and growth in captive collared lemmings (*Dicrostonyx groenlandicus*). *Can J Zool* 53, 777-787.

Hayes, M.J., Roberts, S., and Davare, A. (2000). Transactional conflict between psychobiology and culture in the etiology of postpartum depression. *Med Hypotheses* 55, 266-276.

Hedricks, C., McClintock, M.K. (1985). Timing of mating by postpartum estrous rats. *Z Tierpsychol* 67, 1-16.

Heimer, L., Van Hoesen, G.W. (2006). The limbic lobe and its output channels: implications for emotional functions and adaptive behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 30, 126-147.

Hennessey, A.C., Camak, L., Gordon, F., Edwards, D.A. (1990). Connections between the pontine central gray and the ventromedial hypothalamus are essential for lordosis in female rats. *Behav Neurosci* 104, 477-488.

Hlinak, Z., and Madlafousek, J. (1978). Factors influencing the duration of copulatory posture in female laboratory rat [proceedings]. *Act Nerv Super (Praha)* 20, 115.

Hoshina, Y., Takeo, T., Nakano, K., Sato, T., and Sakuma, Y. (1994). Axon-sparing lesion of the preoptic area enhances receptivity and diminishes proceptivity among components of female rat sexual behavior. *Behav Brain Res* 61, 197-204.

Huse, B., Verca, S.B., Matthey, P., and Rusconi, S. (1998). Definition of a negative modulation domain in the human progesterone receptor. *Mol Endocrinol* 12, 1334-1342.

Ignar-Trowbridge, D.M., Nelson, K.G., Bidwell, M.C., Curtis, S.W., Washburn, T.F., McLachlan, J.A., and Korach, K.S. (1992). Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4658-4662.

Ingegno, M.D., Money, S.R., Thelmo, W., Greene, G.L., Davidian, M., Jaffe, B.M., and Pertschuk, L.P. (1988). Progesterone receptors in the human heart and great vessels. *Lab Invest* 59, 353-356.

Kalra, S.P., Kalra, P. S. (1983). Neural Regulation of Luteinizing Hormone Secretion in the Rat. *Endocrine Reviews* 4, 311-351.

Kariagina, A., Aupperlee, M.D., and Haslam, S.Z. (2008). Progesterone receptor isoform functions in normal breast development and breast cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 18, 11-33.

Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., and Chambon, P. (1990). Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* 9, 1603-1614.

Knotts, T.A., Orkiszewski, R.S., Cook, R.G., Edwards, D.P., and Weigel, N.L. (2001). Identification of a phosphorylation site in the hinge region of the human progesterone receptor and additional amino-terminal phosphorylation sites. *J Biol Chem* 276, 8475-8483.

Kow, L.M., Malsbury, C.W., and Pfaff, D.W. (1976). Lordosis in the male golden hamster elicited by manual stimulation: characteristics and hormonal sensitivity. *J Comp Physiol Psychol* 90, 26-40.

Kow, L.M., and Pfaff, D.W. (1979). Responses of single units in sixth lumbar dorsal root ganglion of female rats to mechanostimulation relevant for lordosis reflex. *J Neurophysiol* 42, 203-213.

Kow, L.M., and Pfaff, D.W. (1998). Mapping of neural and signal transduction pathways for lordosis in the search for estrogen actions on the central nervous system. *Behav Brain Res* 92, 169-180.

Kow, L.M., Zemlan, F.P., and Pfaff, D.W. (1980). Responses of lumbosacral spinal units to mechanical stimuli related to analysis of lordosis reflex in female rats. *J Neurophysiol* 43, 27-45.

Kraus, W.L., and Katzenellenbogen, B.S. (1993). Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists. *Endocrinology* 132, 2371-2379.

Kraus, W.L., Montano, M.M., and Katzenellenbogen, B.S. (1993). Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters. *Mol Endocrinol* 7, 1603-1616.

Kraus, W.L., Montano, M.M., and Katzenellenbogen, B.S. (1994). Identification of multiple, widely spaced estrogen-responsive regions in the rat progesterone receptor gene. *Mol Endocrinol* 8, 952-969.

Lange, C.A., Shen, T., and Horwitz, K.B. (2000). Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1032-1037.

Langevin, P., Barclay, MR. (1990). *Hypsignathus monstrosus*. *Mammalian Species* 357, 1-4.

Lanz, R.B., McKenna, N.J., Onate, S.A., Albrecht, U., Wong, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1999). A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex. *Cell* 97, 17-27.

Leonhardt, S.A., Altmann, M., and Edwards, D.P. (1998). Agonist and antagonists induce homodimerization and mixed ligand heterodimerization of human progesterone receptors in vivo by a mammalian two-hybrid assay. *Mol Endocrinol* 12, 1914-1930.

Lim, C.S., Baumann, C.T., Htun, H., Xian, W., Irie, M., Smith, C.L., and Hager, G.L. (1999). Differential localization and activity of the A- and B-forms of the human progesterone receptor using green fluorescent protein chimeras. *Mol Endocrinol* 13, 366-375.

Lydon, J.P., DeMayo, F.J., Funk, C.R., Mani, S.K., Hughes, A.R., Montgomery, C.A., Jr., Shyamala, G., Conneely, O.M., and O'Malley, B.W. (1995). Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* 9, 2266-2278.

Mahesh, V.B. (1985). The dynamic interaction between steroids and gonadotropins in the mammalian ovulatory cycle. *Neurosci Biobehav Rev* 9, 245-260.

Mahesh, V.B., Brann, D.W., and Hendry, L.B. (1996). Diverse modes of action of progesterone and its metabolites. *J Steroid Biochem Mol Biol* 56, 209-219.

Mani, S.K., Blaustein, J.D., Allen, J.M., Law, S.W., O'Malley, B.W., and Clark, J.H. (1994). Inhibition of rat sexual behavior by antisense oligonucleotides to the progesterone receptor. *Endocrinology* 135, 1409-1414.

Mani, S.K., Blaustein, J.D., and O'Malley, B.W. (1997). Progesterone receptor function from a behavioral perspective. *Horm Behav* 31, 244-255.

- Mani, S.K., Reyna, A.M., Chen, J.Z., Mulac-Jericevic, B., and Conneely, O.M. (2006). Differential response of progesterone receptor isoforms in hormone-dependent and -independent facilitation of female sexual receptivity. *Mol Endocrinol* 20, 1322-1332.
- Mathews, D., and Edwards, D.A. (1977). The ventromedial nucleus of the hypothalamus and the hormonal arousal of sexual behaviors in the female rat. *Horm Behav* 8, 40-51.
- Matuszewich, L., Lorrain, D.S., and Hull, E.M. (2000). Dopamine release in the medial preoptic area of female rats in response to hormonal manipulation and sexual activity. *Behav Neurosci* 114, 772-782.
- Mayer, A.D., Rosenblatt, J.S. (1998). A method for regulating the duration of pregnancy and the time of parturition in Sprague-Dawley rats (Charles River CD strain). *Dev Psychobiol* 32, 131-136.
- Mayor, P., Guimaraes, D.A., Lopez-Gatius, F., and Lopez-Bejar, M. (2006). First postpartum estrus and pregnancy in the female collared peccary (*Tayassu tajacu*) from the amazon. *Theriogenology* 66, 2001-2007.
- McKenna, N.J., Lanz, R.B., and O'Malley, B.W. (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20, 321-344.
- Mellish, J.E., Iverson, S.J. (2005). Postpartum dynamics of reproductive hormones in gray and hooded seals. *Marine Mammal Science* 21, 162-168.
- Mendoza-Rodriguez, C.A., Camacho-Arroyo, I., Garcia, G.A., and Cerbon, M.A. (1999). Variations of progesterone receptor and c-fos gene expression in the rat uterus after treatment with norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *Contraception* 59, 339-343.
- Mermelstein, P.G., and Becker, J.B. (1995). Increased extracellular dopamine in the nucleus accumbens and striatum of the female rat during paced copulatory behavior. *Behav Neurosci* 109, 354-365.
- Mesiano, S., Chan, E.C., Fitter, J.T., Kwek, K., Yeo, G., and Smith, R. (2002). Progesterone withdrawal and estrogen activation in human parturition are coordinated by progesterone receptor A expression in the myometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 2924-2930.
- Meyerson, B.J. (1982). Colchicine delays the estrogen-induced copulatory response in the ovariectomized female rat. *Brain Res* 253, 281-286.
- Milgrom, E., and Baulieu, E.E. (1970). Progesterone in uterus and plasma. I. Binding in rat uterus 105,000 g supernatant. *Endocrinology* 87, 276-286.

Misrahi, M., Venencie, P.Y., Saugier-veber, P., Sar, S., Dessen, P., and Milgrom, E. (1993). Structure of the human progesterone receptor gene. *Biochim Biophys Acta* 1216, 289-292.

Modianos, D.T., Delia, H., and Pfaff, D.W. (1976). Lordosis in female rats following medial forebrain bundle lesions. *Behav Biol* 18, 135-141.

Mong, J.A., and Pfaff, D.W. (2004). Hormonal symphony: steroid orchestration of gene modules for sociosexual behaviors. *Mol Psychiatry* 9, 550-556.

Morrison, S., Nakamura, K. (2011). Central neural pathways for thermoregulation. *Front Biosci* 16, 74-104.

Mote, P.A., Balleine, R.L., McGowan, E.M., and Clarke, C.L. (1999). Colocalization of progesterone receptors A and B by dual immunofluorescent histochemistry in human endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 2963-2971.

Mulac-Jericevic, B., Mullinax, R.A., DeMayo, F.J., Lydon, J.P., and Conneely, O.M. (2000). Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* 289, 1751-1754.

Muths, E., and Hinds, L.A. (1996). Circulating levels of prolactin and progesterone in a wild population of red kangaroos (*Macropus rufus*) Marsupialia: Macropodidae. *Gen Comp Endocrinol* 101, 317-322.

Neumann, I.D. (2008). Brain oxytocin: a key regulator of emotional and social behaviours in both females and males. *J Neuroendocrinol* 20, 858-865.

Ogawa, S., Olazabal, U.E., Parhar, I.S., and Pfaff, D.W. (1994). Effects of intrahypothalamic administration of antisense DNA for progesterone receptor mRNA on reproductive behavior and progesterone receptor immunoreactivity in female rat. *J Neurosci* 14, 1766-1774.

Paredes, R.G., and Agmo, A. (2004). Has dopamine a physiological role in the control of sexual behavior? A critical review of the evidence. *Prog Neurobiol* 73, 179-226.

Park-Sarge, O.K., and Mayo, K.E. (1994). Regulation of the progesterone receptor gene by gonadotropins and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in rat granulosa cells. *Endocrinology* 134, 709-718.

Parsons, B., McGinnis, M.Y., and McEwen, B.S. (1981). Sequential inhibition of progesterone: effects on sexual receptivity and associated changes in brain cytosol progestin binding in the female rat. *Brain Res* 221, 149-160.

Pearce, P.T., Khalid, B.A., and Funder, J.W. (1983). Progesterone receptors in rat thymus. *Endocrinology* 113, 1287-1291.

Peterfi, Z., Makara, G.B., Obal, F., Jr., and Krueger, J.M. (2009). The anterolateral projections of the medial basal hypothalamus affect sleep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296, R1228-1238.

Pfaff, D.W. (1999). *Drive: Neurobiological and molecular mechanisms of sexual motivation* (Cambridge, The MIT Press).

Pfaff, D.W., Sakuma, Y., Kow, L.M., Lee, A.W.L., Easton, A. (2006). Hormonal, neural, and genomic mechanisms for female reproductive behaviors, motivation, and arousal. In *Physiology of reproduction*, E.K. Knobil, Neill, J.D. , ed. (New York, Elsevier Academic Press), pp. 1825-1920.

Pieber, D., Allport, V.C., Hills, F., Johnson, M., and Bennett, P.R. (2001). Interactions between progesterone receptor isoforms in myometrial cells in human labour. *Mol Hum Reprod* 7, 875-879.

Poletti, A., Conneely, O.M., McDonnell, D.P., Schrader, W.T., O'Malley, B.W., and Weigel, N.L. (1993). Chicken progesterone receptor expressed in *Saccharomyces cerevisiae* is correctly phosphorylated at all four Ser-Pro phosphorylation sites. *Biochemistry* 32, 9563-9569.

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

Pollow, K., Geilfuss, J., Boquoi, E., and Pollow, B. (1978). Estrogen and progesterone binding proteins in normal human myometrium and leiomyoma tissue. *J Clin Chem Clin Biochem* 16, 503-511.

Powers, B., and Valenstein, E.S. (1972a). Sexual receptivity: facilitation by medial preoptic lesions in female rats. *Science* 175, 1003-1005.

Powers, J.B., and Valenstein, E.S. (1972b). Individual differences in sexual responsiveness to estrogen and progesterone in ovariectomized rats. *Physiol Behav* 8, 673-676.

Prates, E.J., and Guerra, R.F. (2005). Parental care and sexual interactions in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) during the postpartum estrus. *Behav Processes* 70, 104-112.

Puri, C.P., and Garfield, R.E. (1982). Changes in hormone levels and gap junctions in the rat uterus during pregnancy and parturition. *Biol Reprod* 27, 967-975.

Rogatsky, I., Trowbridge, J.M., and Garabedian, M.J. (1999). Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *J Biol Chem* 274, 22296-22302.

Rowan, B.G., Garrison, N., Weigel, N.L., and O'Malley, B.W. (2000). 8-Bromo-cyclic AMP induces phosphorylation of two sites in SRC-1 that facilitate ligand-independent activation of the chicken progesterone receptor and are critical for functional cooperation between SRC-1 and CREB binding protein. *Mol Cell Biol* 20, 8720-8730.

Roy, E.J., and Wade, G.N. (1977). Binding of [3-H]estradiol by brain cell nuclei and female rat sexual behavior: inhibition by antiestrogens. *Brain Res* 126, 73-87.

Rubin, B.S., and Barfield, R.J. (1983). Progesterone in the ventromedial hypothalamus facilitates estrous behavior in ovariectomized, estrogen-primed rats. *Endocrinology* 113, 797-804.

Sakuma, Y., and Pfaff, D.W. (1980). Excitability of female rat central gray cells with medullary projections: changes produced by hypothalamic stimulation and estrogen treatment. *J Neurophysiol* 44, 1012-1023.

Schumacher, M., Robert, F. (2002). Progesterone: synthesis, metabolism, mechanisms of action, and effects in the nervous system. In *Hormones, Brain and Behavior*, Vol 3, D.W. Pfaff, Arnold, A. P., Etgen, A. M., Fahrbach, S. E., Rubin, R. T., ed. (Amsterdam, Academic Press), pp. 683-745.

Shaikh, A.A. (1971). Estrone and estradiol levels in the ovarian venous blood from rats during the estrous cycle and pregnancy. *Biol Reprod* 5, 297-307.

Shao, R., Markstrom, E., Friberg, P.A., Johansson, M., and Billig, H. (2003). Expression of progesterone receptor (PR) A and B isoforms in mouse granulosa cells: stage-dependent PR-mediated regulation of apoptosis and cell proliferation. *Biol Reprod* 68, 914-921.

Shao, R., Weijdegard, B., Ljungstrom, K., Friberg, A., Zhu, C., Wang, X., Zhu, Y., Fernandez-Rodriguez, J., Egecioglu, E., Rung, E., *et al.* (2006). Nuclear progesterone receptor A and B isoforms in mouse fallopian tube and uterus: implications for expression, regulation, and cellular function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291, E59-72.

Sheridan, P.L., Evans, R.M., and Horwitz, K.B. (1989). Phosphotryptic peptide analysis of human progesterone receptor. New phosphorylated sites formed in nuclei after hormone treatment. *J Biol Chem* 264, 6520-6528.

Szymusiak, R., Gvilia, I., McGinty, D. (2007). Hypothalamic control of sleep. *Sleep Med* 8, 291-301.

Takiguchi, S., Sugino, N., Esato, K., Karube-Harada, A., Sakata, A., Nakamura, Y., Ishikawa, H., and Kato, H. (2004). Differential regulation of apoptosis in the corpus luteum of pregnancy and newly formed corpus luteum after parturition in rats. *Biol Reprod* 70, 313-318.

Takimoto, G.S., Hovland, A.R., Tasset, D.M., Melville, M.Y., Tung, L., and Horwitz, K.B. (1996). Role of phosphorylation on DNA binding and transcriptional functions of human progesterone receptors. *J Biol Chem* 271, 13308-13316.

Tardif, S.D., Smucny, D.A., Abbott, D.H., Mansfield, K., Schultz-Darken, N., and Yamamoto, M.E. (2003). Reproduction in captive common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Comp Med* 53, 364-368.

Tardif, S.D., Smucny, D.A., Abbott, D.H., Mansfield, K., Schultz-Darken, N., Yamamoto, M.E. (2003). Reproduction in captive common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Comp Med* 53, 364-368.

Tennent, B.J., Smith, E.R., and Davidson, J.M. (1980). The effects of estrogen and progesterone on female rat proceptive behavior. *Horm Behav* 14, 65-75.

Terner, C. (1977). Progesterone and progestins in the male reproductive system. *Ann N Y Acad Sci* 286, 313-320.

Truss, M., and Beato, M. (1993). Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr Rev* 14, 459-479.

Tsai, M., O'Malley, B.W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 451-486.

Tseng, L., and Zhu, H.H. (1997). Regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid by progestin in human endometrial stromal cells. *Biol Reprod* 57, 1360-1366.

Turcotte, J.C., and Blaustein, J.D. (1993). Immunocytochemical localization of midbrain estrogen receptor- and progestin receptor-containing cells in female guinea pigs. *J Comp Neurol* 328, 76-87.

Tyagi, R.K., Amazit, L., Lescop, P., Milgrom, E., and Guiochon-Mantel, A. (1998). Mechanisms of progesterone receptor export from nuclei: role of nuclear localization signal, nuclear export signal, and ran guanosine triphosphate. *Mol Endocrinol* 12, 1684-1695.

Uphouse, L. (2000). Female gonadal hormones, serotonin, and sexual receptivity. *Brain Res Brain Res Rev* 33, 242-257.

Vegeto, E., Shahbaz, M.M., Wen, D.X., Goldman, M.E., O'Malley, B.W., and McDonnell, D.P. (1993). Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* 7, 1244-1255.

Villamar-Cruz, O., Manjarrez-Marmolejo, J., Alvarado, R., and Camacho-Arroyo, I. (2006). Regulation of the content of progesterone and estrogen receptors, and

their cofactors SRC-1 and SMRT by the 26S proteasome in the rat brain during the estrous cycle. *Brain Res Bull* 69, 276-281.

Vivo, R., Santisteban, R., Tovar, P., Castejón, F. (1985). Duración del período estral en yeguas árabes y españolas. *Archivos de zootecnia* 34, 67-77.

Wagner, B.L., Norris, J.D., Knotts, T.A., Weigel, N.L., and McDonnell, D.P. (1998). The nuclear corepressors NCoR and SMRT are key regulators of both ligand- and 8-bromo-cyclic AMP-dependent transcriptional activity of the human progesterone receptor. *Mol Cell Biol* 18, 1369-1378.

Yang, L.Y., and Clements, L.G. (2000). MPOA lesions affect female pacing of copulation in rats. *Behav Neurosci* 114, 1191-1202.

Ying, S.Y., Gove, S., Fang, V.S., and Greep, R.O. (1973). Ovulation in postpartum rats. *Endocrinology* 92, 108-116.

Ylikomi, T., Gasc, J.M., Isola, J., Baulieu, E.E., and Tuohimaa, P. (1985). Progesterone receptor in the chick bursa of fabricius: characterization and immunohistochemical localization. *Endocrinology* 117, 155-160.

Yoshida, T., Suzuki, H., Hattori, Y., Noda, K., Tohoku, J., (1981). Hormonal changes around the parturition in rats. *Exp Med* 135, 87-91.

Yoshinaga, K., Hawkins, R.A., and Stocker, J.F. (1969). Estrogen secretion by the rat ovary in vivo during the estrous cycle and pregnancy. *Endocrinology* 85, 103-112.

Zemlan, F.P., and Pfaff, D.W. (1975). Lordosis after cerebellar damage in female rats. *Horm Behav* 6, 27-33.

Zhang, Y., Beck, C.A., Poletti, A., Clement, J.P.t., Prendergast, P., Yip, T.T., Hutchens, T.W., Edwards, D.P., and Weigel, N.L. (1997). Phosphorylation of human progesterone receptor by cyclin-dependent kinase 2 on three sites that are authentic basal phosphorylation sites in vivo. *Mol Endocrinol* 11, 823-832.

Zhang, Y., Beck, C.A., Poletti, A., Edwards, D.P., and Weigel, N.L. (1994). Identification of phosphorylation sites unique to the B form of human progesterone receptor. In vitro phosphorylation by casein kinase II. *J Biol Chem* 269, 31034-31040.

Zhang, Y., Beck, C.A., Poletti, A., Edwards, D.P., and Weigel, N.L. (1995). Identification of a group of Ser-Pro motif hormone-inducible phosphorylation sites in the human progesterone receptor. *Mol Endocrinol* 9, 1029-1040.

Ziegler, T.E., Schultz-Darken, N.J., Scott, J.J., Snowdon, C.T., and Ferris, C.F. (2005). Neuroendocrine response to female ovulatory odors depends upon social condition in male common marmosets, *Callithrix jacchus*. *Horm Behav* 47, 56-64.

ANEXOS



Role of progesterone receptors during postpartum estrus in rats

Graciela Elena Carrillo-Martínez^a, Porfirio Gómora-Arrati^b, Aliesha González-Arenas^a, Sumiko Morimoto^c, Ignacio Camacho-Arroyo^a, Oscar González-Flores^{b,*}

^a Facultad de Química, Departamento de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, Mexico

^b Centro de Investigación en Reproducción Animal, CINVESTAV-Universidad Autónoma de Tlaxcala, Apartado Postal 64, c.p. 90000 Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico

^c Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México DF, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 May 2010

Revised 1 October 2010

Accepted 4 October 2010

Available online 13 October 2010

Keywords:

Hypothalamus

Lordosis

Postpartum estrus

Preoptic area

Progesterone

Progesterone receptor isoforms

ABSTRACT

We studied the role of progesterone receptor (PR) in the display of female sexual behavior during postpartum estrus in rats. Adult female rats were treated with the PR antagonist, RU486 (1.25 and 5 mg), 3 h after parturition and sexual behavior was evaluated throughout the first postpartum day. Estradiol and progesterone serum levels changed during the first 24 h postpartum. The highest estradiol and progesterone levels were found at 9 and 12 h postpartum, respectively. The predominant PR isoform in the hypothalamus and the preoptic area was PR-A during postpartum day. The content of PR-A increased at 6 h postpartum in the hypothalamus and the preoptic area, and decreased in both regions at 9 h. PR-B content only increased in the preoptic area at 12 h postpartum. The highest display of lordotic and proceptive behaviors were found at 12 h postpartum. The treatment with 1.25 and 5 mg of RU486 respectively reduced lordosis by 61% and 92% at 12 h postpartum. These results suggest that PR is essential in the display of postpartum estrus in rats.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

In the evening following parturition, females of several mammalian species ovulate and become sexually receptive. In rats, this postpartum estrus usually occurs during the first 24 h following parturition (Connor and Davis, 1980a; Dewsbury, 1990; Hayes, 2000; Tardif et al., 2003; Mellish and Iverson, 2005; DelBarco-Trillo and Ferkin, 2006; Mayor et al., 2006). Previous studies have shown that lordotic expression occurred as early as 6 h following the onset of parturition, however, maximal lordosis was expressed at 9 and 12 h after the initiation of parturition and ended by 21 h postpartum (Connor and Davis, 1980a; Beyer et al., 2007). If a female rat fails to conceive during this period, a lactational diestrus begins, and it will not present estrous cycles for 25 to 30 days until pups are weaned, but if a female does conceive, postpartum mating will simultaneously result in gestation and lactation of two different litters (Gilbert et al., 1980; Connor and Davis, 1980a).

In rodents with regular estrus cycle, female sexual behavior is induced by the sequential action of estradiol (E) and progesterone (P). E prepares the neural substrates for lordosis, and P triggers the onset and increases the intensity of this behavior (Boiling and Blandau, 1939; Edwards et al., 1968; Beyer et al., 2003; Blaustein, 2008). In ovariectomized female rodents an injection of E followed by P not earlier than 18 h induces sexual behavior indistinguishable from

natural estrus behavior (Blaustein and Feder, 1979; Blaustein, 2008; Frye and Walf, 2010).

Connor and Davis (1980b) found that the highest plasma levels of E levels were found at 3 h postpartum with a significant fall at 6 h. Besides, P levels steadily increased between 3 and 12 h postpartum. At this time, the percentage of females displaying lordosis was low but by 9 h postpartum, all females displayed lordosis. This increase was related to that of P levels (Connor and Davis, 1980b).

From both the analysis of hormones profile during the estrous cycle and pharmacological studies it is considered that P regulates the initiation and duration of behavioral estrus in the rat, but its role in the display of postpartum estrus is not known. It has been proposed that sex steroid postpartum surge is triggered by parturition (Fox and Smith, 1984), and its effect in estrus behavior and ovulation has not been determined.

P effects on sexual behavior are mediated by its intracellular receptor (PR) that is located in specific hypothalamic nuclei, in particular the ventromedial nucleus and the medial preoptic area (Etgen and Barfield, 1986; González-Flores et al., 2004; Pfaff et al., 2006; Guerra-Araiza et al., 2009). A large number of studies have demonstrated a close temporal correlation between estrogen induction of hypothalamic PR and female rodent lordotic responses (Blaustein and Feder, 1979; Blaustein, 1982; Wise and Parsons, 1984; Guerra-Araiza et al., 2003).

A significant increase in the number of PR expressing neurons in the medial preoptic area at the end of pregnancy and at parturition as compared with virgin rats at proestrus when circulating E levels were the highest has been reported (Francis et al., 2002). In contrast,

* Corresponding author. Fax: +52 246 46 21727.

E-mail address: oglezflo@prodigy.net.mx (O. González-Flores).

Numan et al. (1999) found no differences in PR expression in the medial preoptic area between late pregnant and proestrous/estrous rats but no information about PR expression in the brain during the first postpartum day is available.

In the rat, PR is expressed as two isoforms: a full-length form (PR-B, ~110 kDa) and an N-terminally truncated form (PR-A, ~86 kDa). Both PR isoforms are derived from the same gene and are generated from either alternative transcriptional or translational start sites (Kastner et al., 1990). PR isoforms differ in their ability to activate distinct target genes in the same cell (Camacho-Arroyo et al., 2007). PR-A/PR-B mRNA and protein content ratios vary in different rat brain regions (Camacho-Arroyo et al., 1998; Guerra-Araiza et al., 2003) and under distinct hormonal conditions, such as during the estrus cycle or after sexual maturity (Guerra-Araiza et al., 2001, 2002).

In many studies, antiprogestins have been used as pharmacological tools to study the role of PR in lordotic behavior, especially RU486 because of its high affinity for both PR isoforms (Meyer et al., 1990). RU486 is a competitive antagonist that blocks the transcription of P-dependent genes (Mahajan and London, 1997), reduces estrus receptivity in intact females (Telleria et al., 1997), and antagonizes lordosis activity induced by P or A-ring reduced progestins in E-primed female rats (Beyer et al., 1995; Brown and Blaustein, 1986; González-Mariscal et al., 1989; Barbosa-Vargas et al., 2009).

Due to the lack of studies about the neuroendocrine mechanisms involved in the display of postpartum estrus, the purpose of this study was to provide information on the role of PR in the display of sexual behavior during postpartum estrus, and its correlation with E and P levels. In the first experiment, we determined the onset of postpartum estrus in Sprague–Dawley rats, since previous studies have been performed in Long-Evans rats. In the second experiment, we quantified the serum levels of E and P by radioimmunoassay throughout the first postpartum day. In the third experiment, we explored the role of PR in postpartum estrus by using RU486, and in the last experiment, we analyzed whether PR isoforms content is differentially expressed in hypothalamus and preoptic area during the first postpartum day.

Materials and methods

Animals

Fifty one adult female Sprague–Dawley rats (250 g) maintained under a 14:10 h light/dark cycle (lights on 06.00 h) with food and water available *ad libitum* were used in this study. In a room with reverse light/dark cycle all females were mated with proven breeders, until they received three ejaculations to assure pregnancy. We used the method proposed by Mayer and Rosenblatt (1998) for controlling the duration of gestation and the time of parturition, since this method allows experimenters to have a uniform starting time (gestation Day 22) for any postpartum experimental procedure. After mating, females were individually placed in rat breeding cages, and on day 7 of pregnancy, between 12:00 and 13:00 h, they were moved to cages in another room under the normal light/dark cycle, where they remained until parturition. Thus, on day 22, females began parturition during the light phase, regularly between 8:00 and 12:00 h. All the experiments were performed under the guidelines of the Mexican Law of Animal Protection (NOM-062-ZOO-1999) under the approval and supervision of the Institutional Committee for the Use and Care of Laboratory Animals (CICUAL), from Universidad Nacional Autónoma de México.

Experiment 1. Analysis of female sexual behavior during postpartum

Tests for sexual behavior (receptivity and proceptivity) were conducted at 3, 6, 9, 12, 15, 18, and 24 h after delivery of the first pup. Observations at 3, 9 and 24 h were made under light conditions, while

observations at 12, 15, and 18 h were made under red light (30 wt). Females were placed in a circular Plexiglas arena (53 cm in diameter × 40 cm height) with proven breeders. The lordosis quotient [LQ = (number of lordotic displays/10 mounts) × 100] was used to assess receptive behavior. Proceptivity was measured by determining the incidence of hopping, darting, and ear-wiggling throughout the entire receptivity test. The proportion of animals displaying any of these behavioral patterns in each experimental group was analyzed. In this first experiment 10 untreated control female rats were used.

Experiment 2. Radioimmunoassay for E and P

Twenty females (4/group) were rapidly decapitated by using a guillotine, in order to minimize suffering, at 3, 6, 9, 12 and 24 h following delivery. Blood was obtained from rats trunk, and centrifuged at 3500 rpm for 15 min at room temperature. Serum was then withdrawn and frozen for storage until the E and P radioimmunoassay was conducted. E and P concentrations were measured by using the solid phase ¹²⁵I technique with the ACTIVE kit (Diagnostic Systems Laboratories, TX, USA) following the method described by the manufacturer. Sensitivities for E and P with this method were 7.0 pg/ml and 0.1 ng/ml, respectively. The intra-assay coefficients of variation (CVs) for E and P were 5.2 and 8.1 respectively, and the inter-assay CVs for E and P were 7.9 and 10.8.

Experiment 3. Effect of RU 486 on postpartum estrus display

Three hours after delivery, 21 females (7/group) were randomly assigned to a subcutaneous administration of: (i) 400 μl of vehicle (corn oil/10% ethanol/5% benzyl benzoate), (ii) RU486 (1.25 mg/rat), (iii) RU486 (5 mg/rat). Behavioral tests were then performed as described at 3, 6, 9 and 12 h after delivery. RU486 was administered 3 h after the onset of labor, before the increase in P levels, to ensure that PR was not occupied by its natural ligand. The doses of RU486 were selected from previous studies showing their effectiveness for interfering with lordosis behavior (Beyer et al., 1995; Pleim et al., 1990).

Experiment 4. Western blot detection of PR isoforms during postpartum period

The same females used for quantifying E and P levels in Experiment 2 were analyzed in this experiment. Rat brains were obtained (4 animals/group) at 3, 6, 9, 12 and 24 h postpartum. Once the rat brain was obtained, the hypothalamus (limited by the optic chiasm and the caudal portion of the mammillary bodies that laterally limit the hypothalamic commissures (AP:6.8 to 5.4, L:1 to -1, V:0.3 to 1) and the preoptic area (limited by the optic chiasm to the anterior commissure whose anteroventral limit was the nucleus of the diagonal band of Broca (AP:8.74 to 7.2, L:1 to -1, V:0.3 to 0.8) were excised according to the Atlas of Paxinos and Watson (1968) and immediately processed for protein extraction.

Rat brain regions were homogenized in RIPA lysis buffer with protease inhibitors (20 mM Tris–HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 200 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1 μg/ml Leupeptin, 1 μg/ml Aprotinin, 1 μg/ml Pepstatin). Proteins were obtained by centrifugation for 30 min at 13 500 rpm at 4 °C and quantified by the Bradford method (BioRad; Carlsbad, CA, USA). Proteins (100 μg) were separated by electrophoresis on 7.5% SDS-PAGE at 95 V. Pre-stained markers (BioRad) were included for size determination. Gels were transferred to nitrocellulose membranes (Amersham-GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) 120 min at 70 mV that were subsequently blocked 1 h at 4 °C with 5% nonfat dry milk diluted in 0.05% tween-20 Tris-buffered saline and incubated overnight at 4 °C with 5 μg/ml of rabbit anti-PR polyclonal antibody Ab-13 (Thermo Fisher Scientific, Cheshire, UK) which recognizes both PR isoforms with similar affinity.

After incubation with the primary antibody, membranes were washed and incubated for 1 h with a 1:5000 dilution of mouse anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (Neo Markers). Bands were detected by chemiluminescence. Blots were developed with the ECL kit (Amersham, Bucks, UK) and exposed 10 min to Biomax Light Film (Kodak). To test the specificity of the rabbit anti-PR polyclonal antibody used in our study, 5 µg/ml of this antibody were preabsorbed overnight at 4 °C with 100 µg/ml of uterine proteins from an ovariectomized rat treated with E. Blots prepared as described above were incubated with the preabsorbed antibody, and western blots were performed as previously described (data not shown).

To correct for differences in the amount of total protein loaded in each lane, blots were stripped with glycine (0.1 M, pH 2.5, 0.5% SDS) overnight at 4 °C and 30 min at 37 °C and reprobed with 1 µg/ml of mouse anti-α-tubulin polyclonal antibody (NeoMarkers) overnight at 4 °C. Blots were incubated for 1 h with a 1:10 000 dilution of goat antimouse IgG conjugated to horseradish peroxidase (Neo Markers) and detected by chemiluminescence. The intensity of PR isoforms or α-tubulin signals was quantified by densitometry using the software Chemilmager 4400. The expression level of each PR isoform was normalized to that of α-tubulin.

Statistical analysis

The effect of RU486 on postpartum estrus was assessed by comparing LQs from rats treated with vehicle with those from animals treated with RU486. A Kruskal–Wallis test followed by Wilcoxon Mann–Whitney test was used to analyze proceptivity (Bruning and Kintz, 1987; Siegel and Castellan, 1988). The other data including radioimmunoassay and western blot results were analyzed by an ANOVA followed by post hoc analysis with Tukey test. GraphPad Prism version 4.00 for Windows (GraphPad Software, CA, USA) was used for calculating probability values.

Results

Experiment 1. Analysis of female sexual behavior during postpartum

Sexual behavior was analyzed throughout the first postpartum day. A dramatic change in lordotic and proceptive behaviors was observed during the first 24 h after parturition. At 9 h, the LQ was about 25 and it significantly increased ($F = 46.37$, $p < 0.001$) at 12 and 15 h (LQ = 93 and 76, respectively). At 18 h, lordosis behavior clearly decreased (LQ = 30, $p < 0.05$) and at 24 h no females displayed sexual behavior (Fig. 1, panel A). Similar latency values were observed in the display of proceptivity. At 9 h, 30% females showed some proceptive behavior, whereas at 12 and 15 h after parturition, 90 and 80% females showed intense proceptivity ($p < 0.05$). At 18 and 24 h proceptive behavior dramatically diminished (LQ = 40 and 0, respectively).

Experiment 2. Radioimmunoassay for E and P

Serum levels of E and P were quantified by radioimmunoassay in postpartum female rats at 3, 6, 9, 12, and 24 h postpartum. An increase in E levels was found at 9 h postpartum compared with E levels at 3, 6 and 12 h ($F = 6.0392$, $p < 0.05$). The lowest E levels were found at 12 h postpartum (Fig. 2A). Serum levels of P also significantly increased at 9 h postpartum compared with those observed at 3 and 6 h ($F = 15.48$, $p < 0.05$); P levels remained high at 12 h and decreased at 24 h postpartum (Fig. 2B).

Experiment 3. Effect of RU 486 on postpartum estrus display

To assess the role of PR in postpartum estrus, female rats were treated with 1.25 or 5 mg of RU486 at 3 h postpartum and sexual behavior tests were performed at 6, 9 and 12 h postpartum. As in

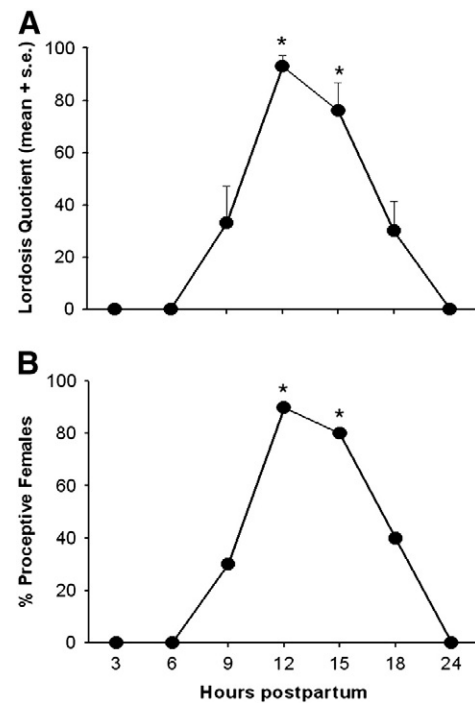


Fig. 1. Changes in LQ and the percentage of proceptive females during the first postpartum day in rats. * $p < 0.05$ compared with 3, 6, 9, 18 and 24 h. Data are expressed as mean \pm SEM. $n = 10$.

experiment 1, females started to show lordosis behavior at 9 h (LQ = 28), with maximum response at 12 h (LQ = 82) postpartum. Both doses of RU486 inhibited sexual behavior. At 12 h, the low dose of RU486 (1.25 mg) significantly reduced (61%) LQ (KW = 13.1; $U = 45$, $p < 0.05$), and the high dose of RU486 (5 mg) reduced it 92% ($U = 51.5$, $p < 0.01$) (Fig. 3A). 88% females treated with vehicle showed proceptivity at 12 h postpartum, whereas 42% and 14% of the animals treated with 1.25 and 5 mg of RU486, respectively, showed proceptive behaviors (KW = 16.3; $U = 45.5$ vehicle vs 1.25 mg RU486; $U = 52$ vehicle vs 5 mg RU486, $p < 0.01$) (Fig. 3B).

Experiment 4. Western blot detection of PR isoforms during postpartum period

PR isoforms content was assessed in the hypothalamus and preoptic area of female rats at 3, 6, 9, 12 and 24 h postpartum by western blot. In both regions we detected a band of 80 kDa that corresponded to PR-A and two bands of 114 and 118 kDa that corresponded to PR-B. α-tubulin was detected as a band of 55 kDa (Fig. 4). The expression level of each PR isoform was determined by the density of the bands obtained in western blot whose value was normalized to that of α-tubulin. This value shows the relative amount of PR isoforms in each analyzed sample, and was used as PR content. Densitometric analysis showed that in the hypothalamus, PR-A content increased at 6 h postpartum ($F = 11.28$, $p < 0.05$), diminished at 9 h, and remained without significant changes until 24 h postpartum (Fig. 5A). By contrast, there were no significant changes in PR-B isoform content in this region. In the preoptic area, PR-A content also increased at 6 h postpartum ($F = 25.0$, $p < 0.05$), diminished at 9 h and increased again at 24 h postpartum. PR-B content increased at 12 h and this increase was maintained at 24 h postpartum ($F = 4.54$, $p < 0.05$) (Fig. 5B). PR-A was the predominant isoform during postpartum period, and in the hypothalamus PR-A content was higher than that of PR-B in all postpartum day (Fig. 6). Interestingly, PR-B/PR-A content increased at 9 and 12 h postpartum in the hypothalamus and the preoptic area, respectively ($p < 0.05$).

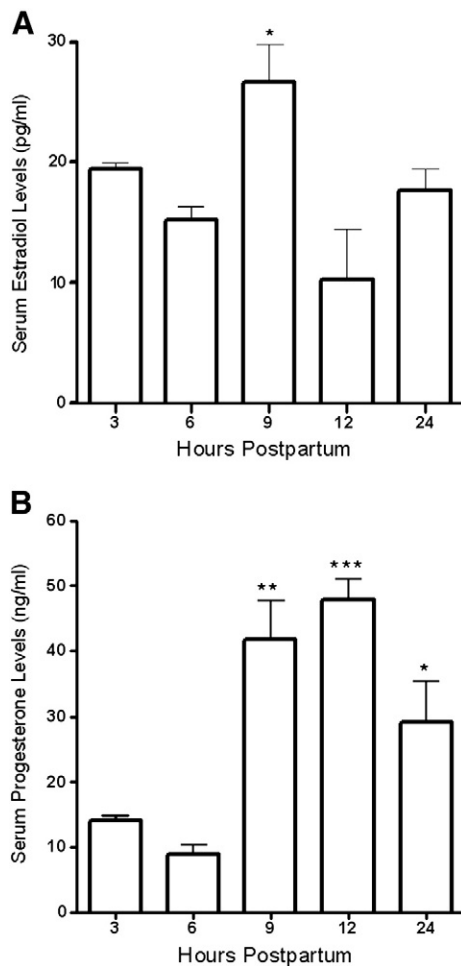


Fig. 2. Estradiol and progesterone levels in serum during the first postpartum day. A. Serum estradiol levels (pg/ml). * $p < 0.05$ compared with 3, 6, and 12 h. B. Serum progesterone levels (ng/ml). * $p < 0.05$ compared with 6 h, ** $p < 0.05$ compared with 3 and 6 h, *** $p < 0.05$ compared with 3, 6 and 24 h. Data are expressed as mean \pm SEM. $n = 4$.

Discussion

Our results show that the highest display of estrus behavior (lordosis and proceptivity) occurred at 12 and 15 h postpartum. This latency was different to that reported by Connor and Davis (1980a), because they found that 30% females displayed lordosis at 6 h postpartum and 100% females displayed it at 9 h postpartum. This slight difference could be due to the rat strains used because they studied Long-Evans rats and we analyzed Sprague–Dawley rats or to differences in the method for regulating the time of parturition since Connor and Davis (1980) used a reversed 12:12 light/dark cycle.

The onset of sexual behavior during the first postpartum day (9 h) coincided with high serum levels of E and P. The highest levels of P found at 12 h agree with those reported by Connor and Davis (1980b). However, they reported that E plasma levels remained low during the entire first postpartum day. In contrast, we found that E serum levels increased at 9 h. Differences in the results could be due to the distinct methods used to measure hormone levels: Connor and Davis determined E levels from plasma using petroleum ether and separated free and bound steroids using Dextran-coated charcoal. In line with our data, Yoshinaga et al. (1969) and Yoshida et al. (1981) described that E levels in plasma suddenly increased on the last gestational day before parturition to more than 70 pg/ml at the onset of labor; Puri and Garfield (1982) also found high E levels (1.5 ng/g) during delivery in uterus tissue samples.

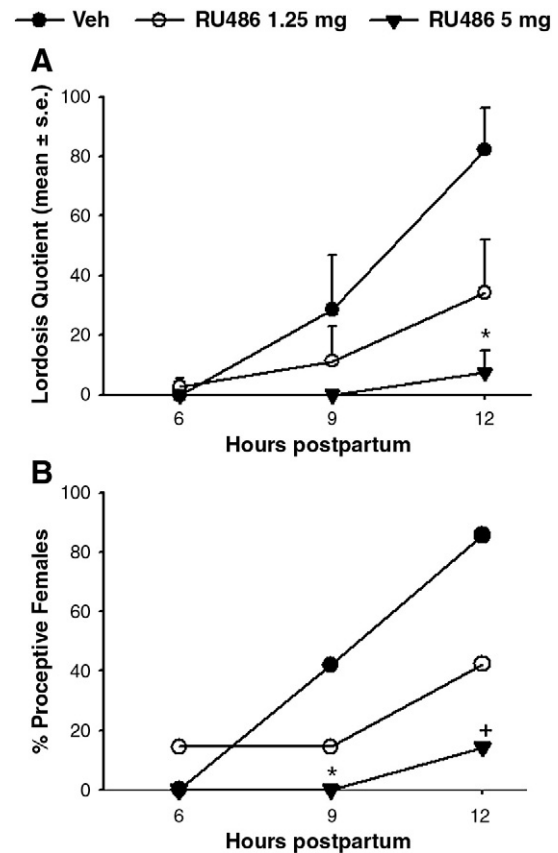


Fig. 3. Effects of RU486 on estrus behavior during postpartum period in female rats. Animals received one injection of 1.25 or 5 mg of RU 486 or vehicle at 3 h postpartum and lordotic and proceptive behaviors were tested. A. LQ during postpartum period. Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. 1.25 and 5 mg. B. Percentage of females that displayed proceptive behaviors during postpartum period. * $p < 0.05$ vs Veh, + $p < 0.05$ vs 1.25 mg and Veh. $n = 7$.

In normal cycling rats, E levels decrease before ovulation, and at the beginning of sexual behavior during the night of proestrus. We found that at 9 h postpartum, E levels were 27 pg/ml. The source of E could be thecal cells from mature follicles before rupture as in normal cycling rats; postpartum ovulation occurs between 15 and 18 h after parturition (Ying et al., 1973; Freeman, 1988; Takiguchi et al., 2004). The increase in E levels in plasma stimulates hypothalamic release of gonadotropin releasing hormone, which in turn triggers an ovulatory surge of luteinizing hormone by the pituitary gland (Freeman, 1988). The source of P secretion before postpartum estrus display (i.e., at 9 or 12 h) is unclear, however, Long and Evans (1922) observed that the ovaries of lactating rats contain two sets of corpora lutea; one remaining from gestation and the other forming after postpartum ovulation. The corpora lutea during gestation do not undergo rapid

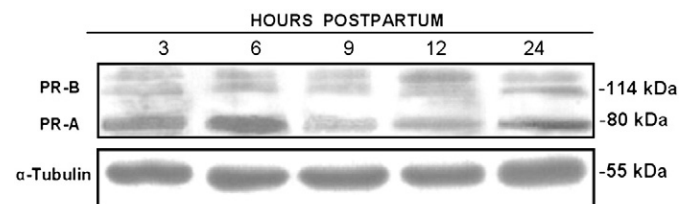


Fig. 4. PR isoforms content in the preoptic area during postpartum period. A Representative assay of a Western blot experiment is shown. Brains were obtained at 3, 6, 9, 12 and 24 h postpartum. Proteins from the preoptic area (100 μ g) were separated by electrophoresis on 7.5% SDS-PAGE. Gels were transferred to nitrocellulose membranes and then incubated with an anti-PR antibody, which recognizes both PR isoforms with the same affinity. PR antibody complex was detected by chemiluminescence (ECL). Blots were stripped, reprobed with anti α -tubulin polyclonal antibody and detected by ECL.

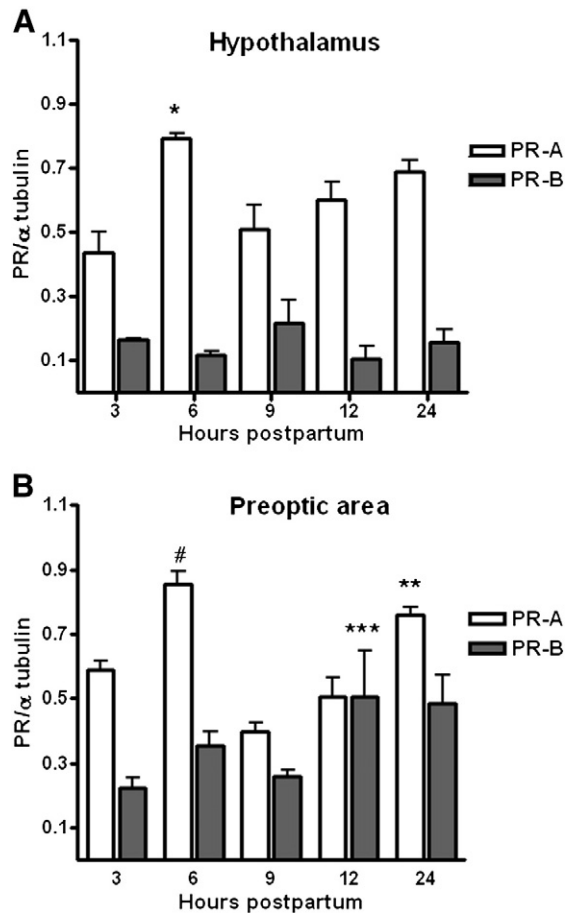


Fig. 5. Densitometric analysis of PR isoform content in the hypothalamus and the preoptic area of the rat during postpartum period. PR-A and PR-B proteins were detected by western blotting of the hypothalamus (A) and the preoptic area (B), quantified by densitometric analysis and corrected using data of α -tubulin protein content. A. * $p < 0.05$ compared with 3 and 9 h. B. # $p < 0.05$ compared with 9 and 12 h, ** $p < 0.05$ compared with 9 h, *** $p < 0.05$ compared with 3 h. Results are expressed as mean \pm SEM. $n = 4$.

structural luteolysis and their contribution to ovarian progesterone secretion could be involved in the expression of postpartum estrus.

The cellular mechanisms involved in the display of estrus behavior during the first postpartum day have been much less studied than during the normal estrous cycle. Previous results have shown that the onset of receptive behavior precedes proceptive behavior by approximately 2 h in the naturally cycling rat (Madlafousek and Hlinak, 1978) and when P is administered to estrogen-primed rats (Glaser et al., 1983; Fadem et al., 1979; Tennent et al., 1980). Rubin and Barfield (1983) studied the time course of estrus behavior induced by P, and they found that P administration in the hypothalamus increased IQ between 1 and 2 h later, but proceptive behavior did not increase until two to four h after hormone administration. Interestingly, our results show that both behaviors (lordosis and proceptivity) have the same latency, beginning at 9 h and decreasing at 18 h after parturition. During this period, females face a conflict between simultaneous demands of copulation and litter care (Gilbert et al., 1980; Agrati et al., 2008). Thus, females must recruit the motivational aspects (e.g. hopping, darting, and ear-wiggling) and the display of intense lordosis to improve behavioral efficiency during postpartum estrus time that must be shared with the male and the litter. Hedricks and McClintock (1985) found that in Sprague–Dawley rats, postpartum copulation was faster than that presented during a cycling estrous due to shorter intervals between intromissions and a higher female attractiveness to the male. Then, the presence of pups does not determine faster postpartum mating, yet postpartum females did exhibit time-sharing

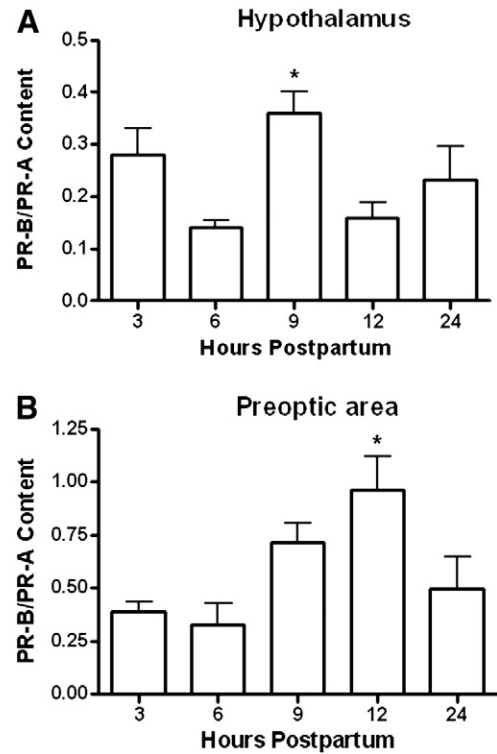


Fig. 6. Changes in the PR-B/PR-A ratio during postpartum period. A. Hypothalamus: * $p < 0.05$ compared with 6 and 12 h. B. Preoptic area. * $p < 0.05$ compared with 3 and 6 h. Results are expressed as mean \pm SEM. $n = 4$.

relationships between their mating and maternal demands. The above mentioned facts suggest that hormonal conditions leading to estrous behavior vary between cyclic and postpartum rats. Indeed, the hormonal surge leading to ovulation in postpartum rats is not prevented by barbiturate administration as in cycling rats unless given shortly after parturition. This finding led Fox and Smith (1984) to suggest that the signal for the gonadotropin surge and presumably for estrous behavior is activated by vagino-cervical stimulation during labor.

Pharmacological studies have shown that the priming effect of E allowing P to initiate estrous behavior requires between 16 and 18 h. Therefore, it appears that rises in postpartum E are not causative of postpartum estrous but perhaps complementary to the effect of E secreted during the last days of pregnancy and parturition. On the other hand, P in the estrogen primed rat stimulates lordosis with a brief latency, the maximal effect occurring around 4 h. The finding that high values of P were found 6 and 9 h postpartum is consistent with the idea that P facilitated estrous behavior during postpartum. Moreover, our results show that PRs are essential during postpartum estrous because the administration of two doses of its antagonist RU486 (1.25 and 5 mg), 3 h after parturition significantly blocked female sexual behavior (lordosis and proceptivity). Many studies support the involvement of intracellular PR in the mechanisms of facilitation of sexual behavior induced by P (Blaustein and Feder, 1979; González-Flores et al., 2004; Pfaff et al., 2006), particularly in the ventromedial hypothalamus (Camacho-Arroyo, et al., 1996). For example, RU486 inhibits P-facilitated lordosis in rats (González-Mariscal et al., 1989; Barbosa-Vargas et al., 2009); intracerebral infusion of antisense oligonucleotides to PR also blocks the lordosis induced by P (Guerra-Araiza et al., 2009) and knockout PR female mice do not show P-facilitated sexual behavior (Lydon et al., 1995).

It is well established that E treatment increases PR protein content in the hypothalamus and the preoptic area of the rat (Dufourny and Waremboyl, 1996; Guerra-Araiza et al., 2003). E peaks found at 3 and 9 h could be correlated with the high PR content observed at 6

and 9–24 h, although the high content of PR-A at 6 h postpartum could reflect the effects of high E serum levels before parturition, as reported by Shaikh (1971), Puri and Garfield (1982), Yoshida et al. (1981) and Elenkov et al. (2001). Parsons et al. (1981) showed the minimum time required for the activation of lordosis reflex by E was 1 h. This effect was associated with an increase in PR expression in the mediobasal hypothalamus and the preoptic area of the rat.

In the rat brain, PR is expressed as two isoforms, a full-length form (PR-B, ~110 kDa) and an N-terminally truncated form (PR-A, ~80 kDa) that are functionally different; however, the same PR gene is capable of synthesizing the two different isoforms (Camacho-Arroyo et al., 2007). Our results showed that the predominant PR isoform during postpartum in the hypothalamus and preoptic area was PR-A. Research with strains of mice with disrupted expression of either PR-A or PR-B has evidenced that PR-A is essential for P-facilitated sexual behavior, but PR-B isoform also has an important role (Mani et al., 2006). Furthermore, a study with antisense oligonucleotides by our group suggests that in rats, PR-B isoform is essential for the display of lordotic behavior in females pretreated with E and P (Guerra-Araiza et al., 2009). In accordance with this result, we observed the highest expression of PR-B during the display of lordotic behavior at 9 h in the hypothalamus and at 12 h postpartum in the preoptic area. In general, PR-B is a stronger activator of transcription than PR-A (Vegeto et al., 1993). In contrast, PR-A is a repressor of the transcriptional activity mediated by PR-B, suggesting that PR-A can diminish the biological effect of P in specific tissues and physiological conditions, as at the end pregnancy and during labor in humans (Vegeto et al., 1993; Pieber et al., 2001; Mesiano et al., 2002). Therefore, P effects depend on PR-A/PR-B ratio. Thus, changes in PR-B/PR-A ratio could reflect different contribution of each PR isoform in the regulation of postpartum estrus behavior. We suppose that the repressor effect of PR-A may decrease the excitability of POA, which tonically inhibits lower neural structures (Powers, 1971; Powers and Valenstein, 1972), during the first postpartum hours, favoring the estrous behavior expression (lordosis and proceptivity). This effect could be reinforced by the activator effects of PR-B in the hypothalamus whose expression increases at 9 h postpartum. It is possible that the differential expression of PR isoforms in the hypothalamus and the preoptic area contributes to the display of estrus behavior during both the estrous cycle and postpartum.

Acknowledgments

This work was supported by a PROMEP grant. Graciela Elena Carrillo-Martínez was sponsored by a Conacyt student grant. This paper is part of Carrillo-Martínez research for the PhD program from Posgrado en Ciencias Biológicas at Universidad Nacional Autónoma de México.

References

- Agrati, D., Fernández-Guasti, A., Ferreira, A., 2008. The reproductive stage and experience of sexually receptive mothers alter their preference for pups or males. *Behav. Neurosci.* 122, 998–1004.
- Barbosa-Vargas, E., Pfau, J.G., Woodside, B., 2009. Sexual behavior in lactating rats: role of estrogen-induced progesterone receptors. *Horm. Behav.* 56, 246–253.
- Beyer, C., González-Flores, O., González-Mariscal, G., 1995. Ring A reduced progestins potentially stimulate estrous behavior in rats: paradoxical effect through the progesterone receptor. *Physiol. Behav.* 58, 985–993.
- 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.
- Beyer, C., Hoffman, K.L., González-Flores, O., 2007. Neuroendocrine regulation of estrous behavior in the rabbit: similarities and differences with the rat. *Horm. Behav.* 52, 2–11.
- Blaustein, J.D., 1982. Alteration of sensitivity to progesterone facilitation of lordosis in guinea pigs by modulation of hypothalamic progestin receptors. *Brain Res.* 243, 287–300.
- Blaustein, J.D., 2008. Neuroendocrine regulation of feminine sexual behavior: lessons from rodent models and thoughts about humans. *Annu. Rev. Psychol.* 59, 93–118.
- Blaustein, J.D., Feder, H.H., 1979. Cytoplasmic progestin-receptors in guinea pig brain: characteristics and relationship to the induction of sexual behavior. *Brain Res.* 169, 481–497.
- Boiling, J.L., Blandau, R., 1939. The estrogen-progesterone induction of mating responses in the spayed female rat. *Endocrinology* 25, 15–27.
- Brown, T.J., Blaustein, J.D., 1986. Abbreviation of the period of sexual behavior in female guinea pigs by the progesterone antagonist RU 486. *Brain Res.* 373, 103–113.
- Bruning, J.L., Kintz, B.L., 1987. *Computational Handbook of Statistics*. Scott, Foresman and Co., Illinois.
- Camacho-Arroyo, I., Pasapera, A.M., Cerbón, M.A., 1996. Regulation of progesterone receptor gene expression by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *Neurosci. Lett.* 214, 25–28.
- Camacho-Arroyo, I., Guerra-Araiza, C., Cerbón, M.A., 1998. Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *Neuroreport* 21, 3993–3996.
- Camacho-Arroyo, I., González-Arenas, A., González Morán, G., 2007. Ontogenic variations in the content and distribution of progesterone receptor isoforms in the reproductive tract and brain of chicks. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 146, 644–652.
- Connor, J.R., Davis, H.N., 1980a. Postpartum estrus in Norway rats. I. *Behavior. Biol. Reprod.* 23, 994–999.
- Connor, J.R., Davis, H.N., 1980b. Postpartum estrus in Norway rats. II. *Physiology. Biol. Reprod.* 23, 1000–1006.
- DelBarco-Trillo, J., Ferkin, M.H., 2006. Similarities between female meadow voles mating during post-partum oestrus and raising two concurrent litters and females raising only one litter. *Reprod. Fertil. Dev.* 18, 751–756.
- Dewsbury, D.A., 1990. Modes of estrus induction as a factor in studies of the reproductive behavior of rodents. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 14, 147–155.
- Dufourny, L., Warembourg, M., 1996. Colocalization of progesterone receptor and somatostatin immunoreactivities in the hypothalamus of the male and female guinea pig. *Neuroendocrinology* 64, 215–224.
- Edwards, D.A., Whalen, R.E., Nadler, R.D., 1968. Induction of estrus: estrogen-progesterone interactions. *Physiol. Behav.* 3, 29–33.
- Elenkov, I.J., Wilder, R.L., Bakalov, V.K., Link, A.A., Dimitrov, M.A., Fisher, S., Crane, M., Kanik, K.S., Chrousos, G.P., 2001. IL-12, TNF-alpha, and hormonal changes during late pregnancy and early postpartum: implications for autoimmune disease activity during these times. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 4933–4938.
- Etgen, A.M., Barfield, R.J., 1986. Antagonism of female sexual behavior with intracerebral implants of antiprogestin RU 38486: correlation with binding to neural progestin receptors. *Endocrinology* 119, 1610–1917.
- Fadem, B.H., Barfield, R.J., Whalen, R.E., 1979. Dose-response and time-response relationships between progesterone and the display of patterns of receptive and proceptive behavior in the female rat. *Horm. Behav.* 13, 40–48.
- Fox, S.R., Smith, M.S., 1984. Postpartum preovulatory surge of gonadotropin secretion may be initiated by the labor process. *Biol. Reprod.* 31, 619–626.
- Francis, K., Meddle, S.L., Bishop, V.R., Russell, J.A., 2002. Progesterone receptor expression in the pregnant and parturient rat hypothalamus and brainstem. *Brain Res.* 927, 18–26.
- Freeman, M.E., 1988. The ovarian cycle of the rat. In: Knobil, E., Neill, J. (Eds.), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, p. 1893.
- Frye, C.A., Wolf, A.A., 2010. Infusions of anti-sense oligonucleotides for DARPP-32 to the ventral tegmental area reduce effects of progesterone and a dopamine type 1-like receptor agonist to facilitate lordosis. *Behav. Brain Res.* 206, 286–292.
- Gilbert, A.N., Pelchat, J.R., Adler, T., 1980. Postpartum copulatory and maternal behaviour in Norway rats under seminatural conditions. *Anim. Behav.* 28, 989–995.
- Glaser, J.H., Rubin, B.S., Barfield, R.J., 1983. Onset of the receptive and proceptive components of feminine sexual behavior in rats following the intravenous administration of progesterone. *Horm. Behav.* 17, 18–27.
- González-Flores, O., Guerra-Araiza, C., Cerbón, M.A., Camacho-Arroyo, I., Etgen, A.M., 2004. The 26S proteasome participates in the sequential inhibition of estrous behavior induced by progesterone in rats. *Endocrinology* 145, 2328–2336.
- González-Mariscal, G., González-Flores, O., Beyer, C., 1989. Intrahypothalamic injection of RU486 antagonizes the lordosis induced by ring A-reduced progestins. *Physiol. Behav.* 46, 435–438.
- Guerra-Araiza, C., Reyna-Neyra, A., Salazar, A.M., Cerbón, M.A., Morimoto, S., Camacho-Arroyo, I., 2001. Progesterone receptor isoforms expression in the prepubertal and adult male rat brain. *Brain Res. Bull.* 54, 113–117.
- Guerra-Araiza, C., Coyoy-Salgado, A., Camacho Arroyo, I., 2002. Sex differences in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in the rat brain. *Brain Res. Bull.* 59, 105–109.
- Guerra-Araiza, C., Villamar-Cruz, O., González-Arenas, A., Chavira, R., Camacho-Arroyo, I., 2003. Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after oestradiol and progesterone treatments. *J. Neuroendocrinol.* 15, 984–990.
- Guerra-Araiza, C., Gómora-Arrati, P., García-Juárez, M., Armengual-Villegas, A., Miranda-Martínez, A., Lima-Hernández, F.J., Camacho-Arroyo, I., González-Flores, O., 2009. Role of progesterone receptor isoforms in female sexual behavior induced by progestins in rats. *Neuroendocrinology* 90, 73–81.
- Hayes, L.D., 2000. To nest communally or not to nest communally: a review of rodent communal nesting and nursing. *Anim. Behav.* 59, 677–688.
- Hedricks, C., McClintock, M.K., 1985. Timing of mating by postpartum estrous rats. *Z. Tierpsychol.* 67, 1–16.
- Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., Chambon, P., 1990. Two distinct estrogen regulated promoters generate transcripts encoding the two

- functionally different human progesterone receptors forms A and B. *EMBO J.* 9, 1603–1614.
- Long, J.A., Evans, H.M., 1922. The oestrus cycle in the rat and its associated phenomena. *Memoirs of the Univ. of California*, vol. 6. Univ. of California Press.
- Lydon, J.P., DeMayo, F.J., Funk, C.R., Mani, S.K., Hughes, A.R., Montgomery, C.A., Shyamala, G., Conneely, O.M., O'Malley, B.W., 1995. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev.* 9, 2266–2278.
- Madlafousek, J., Hlinak, Z., 1978. Sexual behavior of the female laboratory rat: inventory, patterning and measurement. *Behaviour* 63, 129–173.
- Mahajan, D.K., London, S.N., 1997. Mifepristone (RU486): a review. *Fertil. Steril.* 68, 967–976.
- Mani, S.K., Reyna, A.M., Chen, J.Z., Mulac-Jericevic, B., Conneely, O.M., 2006. Differential response of progesterone receptor isoforms in hormone-dependent and -independent facilitation of female sexual receptivity. *Mol. Endocrinol.* 20, 1322–1332.
- Mayer, A.D., Rosenblatt, J.S., 1998. A method for regulating the duration of pregnancy and the time of parturition in Sprague–Dawley rats (Charles River CD strain). *Dev. Psychobiol.* 32, 131–136.
- Mayor, P., Guimaraes, D.A., Lopez-Gatius, F., Lopez-Bejar, M., 2006. First postpartum estrus and pregnancy in the female collared peccary (*Tajassu tajacu*) from the amazon. *Theriogenology* 66, 2001–2007.
- Mellish, J.E., Iverson, S.J., 2005. Postpartum Dynamics of Reproductive Hormones in Gray and Hooded Seals. *Mar. Mammal Sci.* 21, 162–168.
- Mesiano, S., Chan, E.C., Fitter, J.T., Kwek, K., Yeo, G., Smith, R., 2002. Progesterone withdrawal and estrogen activation in human parturition are coordinated by progesterone receptor A expression in the myometrium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 2924–2930.
- Meyer, M.E., Pornon, A., Ji, J.W., Bocquel, M.T., Chambon, P., Gronemeyer, H., 1990. Agonistic and antagonistic activities of RU486 on the functions of the human progesterone receptor. *EMBO J.* 9, 3923–3932.
- Numan, M., Roach, J.K., del Cerro, M.C., Guillamón, A., Segovia, S., Sheehan, T.P., Numan, M.J., 1999. Expression of intracellular progesterone receptors in rat brain during different reproductive states, and involvement in maternal behavior. *Brain Res.* 830, 358–371.
- Parsons, B., Rainbow, T.C., Pfaff, D.W., McEwen, B.S., 1981. Oestradiol, sexual receptivity and cytosol progesterone receptors in rat hypothalamus. *Nature* 292, 58–59.
- Paxinos, G., Watson, C., 1968. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York.
- Pfaff, D.W., Sakuma, Y., Kow, L.M., Lee, A.W.L., Easton, A., 2006. Hormonal, neural, and genomic mechanisms for female reproductive behaviors, motivation, and arousal. In: Knobil, E.K., Neill, J.D. (Eds.), *Physiology of reproduction*. Elsevier Academic Press, New York, pp. 1825–1920.
- Pieber, D., Allport, V.C., Bennett, P.R., 1999. Progesterone receptor isoform A inhibits isoform B-mediated transactivation in human amnion. *Eur. J. Pharmacol.* 427, 7–11.
- Pleim, E.T., Cailliau, P.J., Weinstein, M.A., Etgen, A.M., Barfield, R.J., 1990. Facilitation of receptive behavior in estrogen-primed female rats by the anti-progestin, RU 486. *Horm. Behav.* 24, 301–310.
- Powers, J.B., 1971. Facilitation of lordosis in ovariectomized rats by intracerebral progesterone implants. *Brain Res.* 48, 311–325.
- Powers, J.B., Valenstein, E.S., 1972. Sexual receptivity: facilitation by medial preoptic lesions in female rats. *Science* 175, 1003–1005.
- Puri, C.P., Garfield, R.E., 1982. Changes in hormone levels and gap junctions in the rat uterus during pregnancy and parturition. *Biol. Reprod.* 27, 967–975.
- Rubin, B.S., Barfield, R.J., 1983. Progesterone in the ventromedial hypothalamus facilitates estrous behavior in ovariectomized, estrogen-primed rats. *Endocrinology* 113, 797–804.
- Shaikh, A.A., 1971. Estrone and estradiol levels in the ovarian venous blood from rats during the estrous cycle and pregnancy. *Biol. Reprod.* 5, 297–307.
- Siegel, S., Castellan, N.J., 1988. *Nonparametric Statistics for the Behavioural Sciences*. McGraw-Hill, New York.
- Takiguchi, S., Sugino, N., Esato, K., Karube-Harada, A., Sakata, A., Nakamura, Y., Ishikawa, H., Kato, H., 2004. Differential regulation of apoptosis in the corpus luteum of pregnancy and newly formed corpus luteum after parturition in rats. *Biol. Reprod.* 70, 313–318.
- Tardif, S.D., Smucny, D.A., Abbott, D.H., Mansfield, K., Schultz-Darken, N., Yamamoto, M.E., 2003. Reproduction in captive common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Comp. Med.* 53, 364–368.
- Telleria, C.M., Mezzadri, M.R., Deis, R.P., 1997. Fertility impairment alter mifepristone treatment to rats at proestrus: actions on the hypothalamic-hypophyseal-ovarian axis. *Contraception* 56, 267–274.
- Tennent, B.J., Smith, E.R., Davidson, J.M., 1980. The effects of estrogen and progesterone on female rat proceptive behavior. *Horm. Behav.* 14, 65–75.
- Vegeto, E., Shahbaz, M.M., Goldman, D.X., O'Malley, B.W., McDonnell, D.P., 1993. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol. Endocrinol.* 7, 1244–1255.
- Wise, P.M., Parsons, B., 1984. Nuclear estradiol and cytosol progesterone receptor concentrations in the brain and the pituitary gland and sexual behavior in ovariectomized estradiol-treated middle aged rats. *Endocrinology* 115, 810–816.
- Ying, S.Y., Gove, S., Fang, V.S., Greep, R.O., 1973. Ovulation in postpartum rats. *Endocrinology* 92, 108–116.
- Yoshida, T., Suzuki, H., Hattori, Y., Noda, K., Tohoku, J., 1981. Hormonal changes around the parturition in rats. *Exp. Med.* 135, 87–91.
- Yoshinaga, K., Hawkins, R.A., Stocker, J.F., 1969. Estrogen secretion by the rat ovary in vivo during the estrous cycle and pregnancy. *Endocrinology* 85, 103–112.

Effects of RU486 in the Expression of Progesterone Receptor Isoforms in the Hypothalamus and the Preoptic Area of the Rat during Postpartum Estrus

Graciela Elena Carrillo-Martínez^a., Porfirio Gómora-Arrati^b., Aliesha González-Arenas^a., Gabriel Roldán-Roldán^c., Oscar González-Flores^b., Ignacio Camacho-Arroyo^{a*}.

^aFacultad de Química, Departamento de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México. ^bCentro de Investigación en Reproducción Animal, CINVESTAV-Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México. ^cLaboratorio de Neurobiología de la Conducta, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

*Corresponding author:

Dr. Ignacio Camacho-Arroyo

Facultad de Química,

Universidad Nacional Autónoma de México

México D.F. 04510, México

Tel: (52) 555 622 3732.

Fax: (52) 555 616 2010.

Email: camachoarroyo@gmail.com

Abstract

In several mammalian species females undergo postpartum estrus, a brief period of ovulation and sexual receptivity that in rats usually occurs during the first 24 h following parturition. The maximal lordotic expression occurs at 12 h after the initiation of parturition and depends on intracellular progesterone receptor (PR). We studied the regulation of PR expression by its antagonist, RU486 in the hypothalamus and the preoptic area of the rat during postpartum estrus by western blot. Adult female rats were treated with RU486 (1.25 and 5 mg) 3 h after parturition, and western blot was performed to assess the expression of PR-A and PR-B at 12 h postpartum. RU486 (1.25 and 5 mg) reduced the expression of PR-A (63% and 95%) and that of PR-B (75% and 99%), respectively in the preoptic area whereas it had no effects in the hypothalamus. These results suggest a differential regulation of PR expression in the rat brain during postpartum estrus.

Keywords: Hypothalamus, Lordosis, Postpartum estrus, Preoptic area, Progesterone, Progesterone receptor, RU486.

Introduction

In the evening following parturition, females of several mammalian species ovulate and become sexually receptive. This phenomenon is called postpartum estrus [8,10,26]. Previous studies have shown that lordotic expression occurred as early as 6 h following the onset of parturition, however, maximal lordosis is expressed between 9 and 15 h after parturition initiation and ended by 21 h postpartum [7,8]. If a female rat fails to conceive during this period, a lactational diestrus begins, and it will not present estrous cycles until pups are weaned, but if a female does conceive, postpartum mating will simultaneously result in gestation and lactation of two different litters [8,9,13].

In rodents with regular estrus cycle, female sexual behavior is induced by the sequential action of estradiol (E) and progesterone (P). In a previous work, we found that the onset of sexual behavior during the first postpartum day (9 h) coincided with high serum levels of E and P [7]. P effects on sexual behavior are mediated by its intracellular receptor (PR) located in the ventromedial nucleus and the medial preoptic area [11,16,23]. A large number of studies have demonstrated a close temporal correlation between estrogen induction of PR and female rodent lordotic responses [2,18].

In the rat, PR is expressed as two isoforms: a full-length form (PRB, ~110 kDa) and an N-terminally truncated form (PR-A, ~86 kDa) which differ in their ability to activate distinct target genes in the same cell [5]. PR-A/PR-B mRNA and protein content ratios vary in different rat brain regions and under distinct hormonal conditions, such as during the estrus cycle or after sexual maturity [6,15,17]. We have reported that the content of PR-A increased at 6 h postpartum in the hypothalamus

and the preoptic area, while PR-B content only increased in the preoptic area at 12 h postpartum [7].

RU486 is a competitive PR antagonist that blocks the transcription of P dependent genes [19], reduces estrus receptivity in intact females [27], antagonizes lordosis activity induced by P or A-ring reduced progestins in E primed female rats [1,14] and reduces postpartum sexual behavior (both lordosis and proceptivity) [7]. Due to the lack of studies about the neuroendocrine mechanisms involved in the display of postpartum estrus, the purpose of this study was to provide information about the regulation of PR isoforms expression by RU486 during postpartum estrus.

Methods

Twelve adult female Sprague–Dawley rats (250 g) maintained under a 14:10 h light/dark cycle (lights on 06.00 h) with food and water available *ad libitum* were used in this study. In a room with reverse light/dark cycle all females were mated with proven breeders, until they received three ejaculations to assure pregnancy. We used the method proposed by Mayer and Rosenblatt [20] for controlling the duration of gestation and the time of parturition, since this method allows experimenters to have a uniform starting time (gestation Day 22) for any postpartum experimental procedure. After mating, females were individually placed in rat breeding cages, and on day 7 of pregnancy, between 12:00 and 13:00 h, they were moved to cages in another room under the normal light/dark cycle, where they remained until parturition. Thus, on day 22, females began parturition during the light phase, regularly between 8:00 and 12:00 h. All the experiments were performed under the guidelines of the Mexican Law of Animal Protection

(NOM-062-ZOO-1999), and under the approval and supervision of the Institutional Committee for the Use and Care of Laboratory Animals (CICUAL), from Universidad Nacional Autónoma de México. Three hours after delivery, females (4/group) were randomly assigned to a subcutaneous administration of: (i) 400 μ l of Vehicle (corn oil/10% ethanol/5% benzyl benzoate); (ii) RU486 (1.25 mg/rat) and (iii) RU486 (5 mg/rat). RU486 was administered 3 h after the onset of labor, before the increase in P levels, to ensure that PR was not occupied by its natural ligand. The doses of RU486 were selected from previous studies showing their effectiveness for interfering with lordosis behavior [14]. 12 h after parturition, rat brains were obtained. The hypothalamus (limited by the optic chiasm and the caudal portion of the mammillary bodies that laterally limit the hypothalamic commissures (AP:6.8 to 5.4, L:1 to -1, V:0.3 to 1) and the preoptic area (limited by the optic chiasm to the anterior commissure whose anteroventral limit was the nucleus of the diagonal band of Broca (AP:8.74 to 7.2, L:1 to -1, V:0.3 to 0.8) were excised according to the Atlas of Paxinos and Watson [21] and immediately processed for protein extraction. Rat brain regions were homogenized in RIPA lysis buffer with protease inhibitors (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 200 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1 μ g/ml Leupeptin, 1 μ g/ml Aprotinin, 1 μ g/ml Pepstatin). Proteins were obtained by centrifugation for 30 min at 13,500 rpm at 4°C and quantified by the Bradford method (BioRad; Carlsbad, CA, USA). Proteins (100 μ g) were separated by electrophoresis on 7.5% SDS-PAGE at 95 V. Pre-stained markers (BioRad) were included for size determination. Gels were transferred to nitrocellulose membranes (Amersham-GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) 120 min at 70 mV that were subsequently blocked 1 h at 4°C with 5% nonfat dry milk

diluted in 0.05% tween-20 Tris buffered saline and incubated overnight at 4°C with 5 µg/ml of rabbit anti-PR polyclonal antibody Ab-13 (Thermo Fisher Scientific, Cheshire,UK) which recognizes both PR isoforms with similar affinity. After incubation with the primary antibody, membranes were washed and incubated for 1 h with a 1:5000 dilution of mouse antirabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (Neo Markers). Bands were detected by chemiluminescence. Blots were developed with the ECL kit (Amersham, Bucks, UK) and exposed 10 min to Biomax Light Film (Kodak). To test the specificity of the rabbit anti-PR polyclonal antibody used in our study, 5 µg/ml of this antibody were preabsorbed overnight at 4°C with 100 µg/ml of uterine proteins from an ovariectomized rat treated with E. Blots prepared as described above were incubated with the preabsorbed antibody, and western blots were performed as previously described (data not shown). To correct for differences in the amount of total protein loaded in each lane, blots were stripped with glycine (0.1 M, pH 2.5, 0.5% SDS) overnight at 4°C and 30 min at 37°C and reprobed with 1 µg/ml of mouse anti α -tubulin polyclonal antibody (NeoMarkers) overnight at 4°C. Blots were incubated for 1 h with a 1:10 000 dilution of goat antimouse IgG conjugated to horseradish peroxidase (Neo Markers) and detected by chemiluminescence. The intensity of PR isoforms, and α -tubulin signals was quantified by densitometry using the software Chemilmager 4400. The expression level of each PR isoform was normalized to that of α -tubulin. Data were analyzed by an ANOVA followed by post hoc analysis with Tukey test. GraphPad Prism version 4.00 for Windows (GraphPad Software, CA, USA) was used for calculating probability values.

Results

PR isoforms content was assessed in the hypothalamus and the preoptic area of female rats at 12 h postpartum by western blot. In both regions we detected a band of 80 kDa that corresponded to PR-A and two bands of 114 and 118 kDa that corresponded to PR-B in the hypothalamus, but in the preoptic area we just found one band of 114 kDa; α -tubulin was detected as a band of 55 kDa in both regions (Fig. 1). The ratio of PR-B/PR-A was different in preoptic area and hypothalamus. The PR-B/PR-A ratio was 0.45 in preoptic area and 1.08 in hypothalamus respectively in animals treated with vehicle. Densitometric analysis showed that RU486 administration 3 h after parturition reduced the expression of both PR isoforms in the preoptic area at 12 h postpartum whereas it had no significant effects in the hypothalamus (Figs. 1 and 2). RU486 (1.25 and 5 mg) reduced the expression of PR-A (63% and 95%, $p < 0.05$, $F = 8.096$) and that of PR-B (75% and 99%, $p < 0.05$, $F = 20.132$), respectively in the preoptic area (Fig.1).

Discussion

The administration of RU486 exerted completely different effects upon PR expression in the preoptic area and the hypothalamus of the rat during postpartum estrus. In preoptic area, RU486 reduced both PR isoforms expression, while in hypothalamus it did not exert any significant effect. RU486 antagonizes progestins action by its binding with PR allowing dimerization and binding with DNAs HREs but avoids transcription [4]. After RU486 binding with PR, RU486 could induce PR

phosphorylation and mark it to degradation by 26S proteasome even without transcriptional activation. Previously, it has been reported a reduction of PR isoform expression at protein level after RU486 administration in the uterus, ovary and breast cancer cell lines [12,23,24] or a reduction of PRs mRNA level [28], however, there are reports showing no effects on PR or even an increase in PR isoforms expression by RU486 as in granulosa cells from ovary in mice [25], suggesting that RU486 action on PR expression is tissue-specific. RU486 treatment does not seem to have effects upon E or P levels in serum. We measured the levels of both steroids by radioimmunoassay and we did not find any significant difference in E or P levels in serum between rats treated with RU486 and those with vehicle (data not shown).

We found differences in the regulation of PR by RU486 between two brain areas, in accordance with a previous report from our group, where we described that the expression of PR isoforms is differentially regulated by steroids in several regions of the female rat [18]. We also found a difference between the two areas even in untreated animals, finding just one band for PR-B in preoptic area and two in hypothalamus, this could be due to a different basal phosphorylation of PR-B in each brain area. These results lead us to guessing about PR interactions with other elements from cell signaling pathways and how they can affect antiprogestins action.

By electric stimulation or injury in specific areas it has been assessed that preoptic area exerts repressive effects in lordosis and that electric stimulation in ventromedial hypothalamus enhances lordosis [3]. We cannot discard the heterogeneity of analyzed tissues since the hypothalamus as a whole contains

many different nuclei, thus the effect of RU486 upon ventromedial hypothalamus could be disguised by its action in other nuclei. It remains to investigate which genes are targets for transcription triggered by PR in each brain area in order to understand P action in postpartum estrus.

These results suggest a differential regulation of PR expression by RU486 in the rat brain during postpartum estrus..

References

- [1] E. Barbosa-Vargas, J.G. Pfaus, B. Woodside, Sexual behavior in lactating rats: role of estrogen-induced progesterone receptors, *Horm Behav* 56 (2009) 246-253.
- [2] J.D. Blaustein, T.J. Brown, Progesterone decreases the concentration of hypothalamic and anterior pituitary estrogen receptors in ovariectomized rats, *Brain Res* 304 (1984) 225-236.
- [3] J.D. Blaustein, M.S. Erskine, Feminine sexual behavior: cellular integration of hormonal and afferent information in the rodent forebrain. In: D.W. Pfaff, Arnold, A. P., Etgen, A.M., Fahrbach, S.E., Rubin, R.T. (Ed.), *Hormones, Brain and Behavior.*, Academic Press, New York, 2002, pp. 139-214.
- [4] F. Cadepond, A. Ulmann, E.E. Baulieu, RU486 (mifepristone): mechanisms of action and clinical uses, *Annu Rev Med* 48 (1997) 129-156.

- [5] I. Camacho-Arroyo, A. Gonzalez-Arenas, G. Gonzalez-Moran, Ontogenic variations in the content and distribution of progesterone receptor isoforms in the reproductive tract and brain of chicks, *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 146 (2007) 644-652.
- [6] I. Camacho-Arroyo, S.T. Mendez-Cruz, C. Guerra-Araiza, M.A. Cerbon, Changes in progesterone receptor mRNA content in the rabbit lung during early pregnancy and after sex steroid hormone treatment, *J Endocrinol* 157 (1998) 71-74.
- [7] G.E. Carrillo-Martinez, P. Gomora-Arrati, A. Gonzalez-Arenas, S. Morimoto, I. Camacho-Arroyo, O. Gonzalez-Flores, Role of progesterone receptors during postpartum estrus in rats, *Horm Behav* 59 (2011) 37-43.
- [8] J.R. Connor, H.N. Davis, Postpartum estrus in Norway rats. I. Behavior, *Biol Reprod* 23 (1980a) 994-999.
- [9] J.R. Connor, H.N. Davis, Postpartum estrus in Norway rats. II. Physiology, *Biol Reprod* 23 (1980b) 1000-1006.
- [10] D.A. Dewsbury, Modes of estrus induction as a factor in studies of the reproductive behavior of rodents, *Neurosci Biobehav Rev* 14 (1990) 147-155.
- [11] A.M. Etgen, R.J. Barfield, Antagonism of female sexual behavior with intracerebral implants of antiprogestin RU 38486: correlation with binding to neural progestin receptors, *Endocrinology* 119 (1986) 1610-1617.
- [12] X. Fang, S. Wong, B.F. Mitchell, Effects of RU486 on estrogen, progesterone, oxytocin, and their receptors in the rat uterus during late gestation, *Endocrinology* 138 (1997) 2763-2768.

- [13] A.N. Gilbert, J.R. Pelchat, T. Adler, Postpartum copulatory and maternal behaviour in Norway rats under seminatural conditions, *Anim. Behav* 28 (1980) 989-995.
- [14] G. Gonzalez-Mariscal, O. Gonzalez-Flores, C. Beyer, Intrahypothalamic injection of RU486 antagonizes the lordosis induced by ring A-reduced progestins, *Physiol Behav* 46 (1989) 435-438.
- [15] C. Guerra-Araiza, A. Coyoy-Salgado, I. Camacho-Arroyo, Sex differences in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in the rat brain, *Brain Res Bull* 59 (2002) 105-109.
- [16] C. Guerra-Araiza, P. Gomora-Arrati, M. Garcia-Juarez, A. Armengual-Villegas, A. Miranda-Martinez, F.J. Lima-Hernandez, I. Camacho-Arroyo, O. Gonzalez-Flores, Role of progesterone receptor isoforms in female sexual behavior induced by progestins in rats, *Neuroendocrinology* 90 (2009) 73-81.
- [17] C. Guerra-Araiza, A. Reyna-Neyra, A.M. Salazar, M.A. Cerbon, S. Morimoto, I. Camacho-Arroyo, Progesterone receptor isoforms expression in the prepuberal and adult male rat brain, *Brain Res Bull* 54 (2001) 13-17.
- [18] C. Guerra-Araiza, O. Villamar-Cruz, A. Gonzalez-Arenas, R. Chavira, I. Camacho-Arroyo, Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after oestradiol and progesterone treatments, *J Neuroendocrinol* 15 (2003) 984-990.
- [19] D.K. Mahajan, S.N. London, Mifepristone (RU486): a review, *Fertil Steril* 68 (1997) 967-976.

- [20] A.D. Mayer, J.S. Rosenblatt, A method for regulating the duration of pregnancy and the time of parturition in Sprague-Dawley rats (Charles River CD strain), *Dev Psychobiol* 32 (1998) 131–136.
- [21] G. Paxinos, G. Watson, *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Elsevier, Amsterdam, 2007, 456 pp.
- [22] D.W. Pfaff, Y. Sakuma, L.M. Kow, A.W.L. Lee, A. Easton, Hormonal, neural, and genomic mechanisms for female reproductive behaviors, motivation, and arousal. In: E.K. Knobil, J.D. Neill (Ed.), *Physiology of reproduction*, Elsevier Academic Press, New York, 2006, pp. 1825-1920.
- [23] L.D. Read, C.E. Snider, J.S. Miller, G.L. Greene, B.S. Katzenellenbogen, Ligand-modulated regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein in human breast cancer cell lines, *Mol Endocrinol* 2 (1988) 263-271.
- [24] R. Shao, E. Markstrom, P.A. Friberg, M. Johansson, H. Billig, Expression of progesterone receptor (PR) A and B isoforms in mouse granulosa cells: stage-dependent PR-mediated regulation of apoptosis and cell proliferation, *Biol Reprod* 68 (2003) 914-921.
- [25] R. Shao, B. Weijdegard, K. Ljungstrom, A. Friberg, C. Zhu, X. Wang, Y. Zhu, J. Fernandez-Rodriguez, E. Egecioglu, E. Rung, H. Billig, Nuclear progesterone receptor A and B isoforms in mouse fallopian tube and uterus: implications for expression, regulation, and cellular function, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291 (2006) E59-72.

- [26] S.D. Tardif, D.A. Smucny, D.H. Abbott, K. Mansfield, N. Schultz-Darken, M.E. Yamamoto, Reproduction in captive common marmosets (*Callithrix jacchus*), *Comp Med* 53 (2003) 364-368.
- [27] C.M. Telleria, M.R. Mezzadri, R.P. Deis, Fertility impairment after mifepristone treatment to rats at proestrus: actions on the hypothalamic-hypophyseal-ovarian axis, *Contraception* 56 (1997) 267-274.
- [28] L. Tseng, H.H. Zhu, Regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid by progestin in human endometrial stromal cells, *Biol Reprod* 57 (1997) 1360-1366.

Figure 1. Effects of RU486 on PR isoform content in the preoptic area of the rat during postpartum period. PR-A and PR-B proteins were detected by western blotting, quantified by densitometric analysis and corrected using data of α -tubulin protein content. * $p < 0.05$ compared with Veh and 1.25 mg, + $p < 0.05$ compared with Veh, (PR-A: $F = 8.096$, PR-B: $F = 20.1328$).

Figure 2. Effects of RU486 on PR isoform content in the hypothalamus of the rat during postpartum period. PR-A and PR-B proteins were detected by western blotting, quantified by densitometric analysis and corrected using data of α -tubulin protein content (PR-A: $F = 2.528$, PR-B: $F = 1.932$).

Fig.1

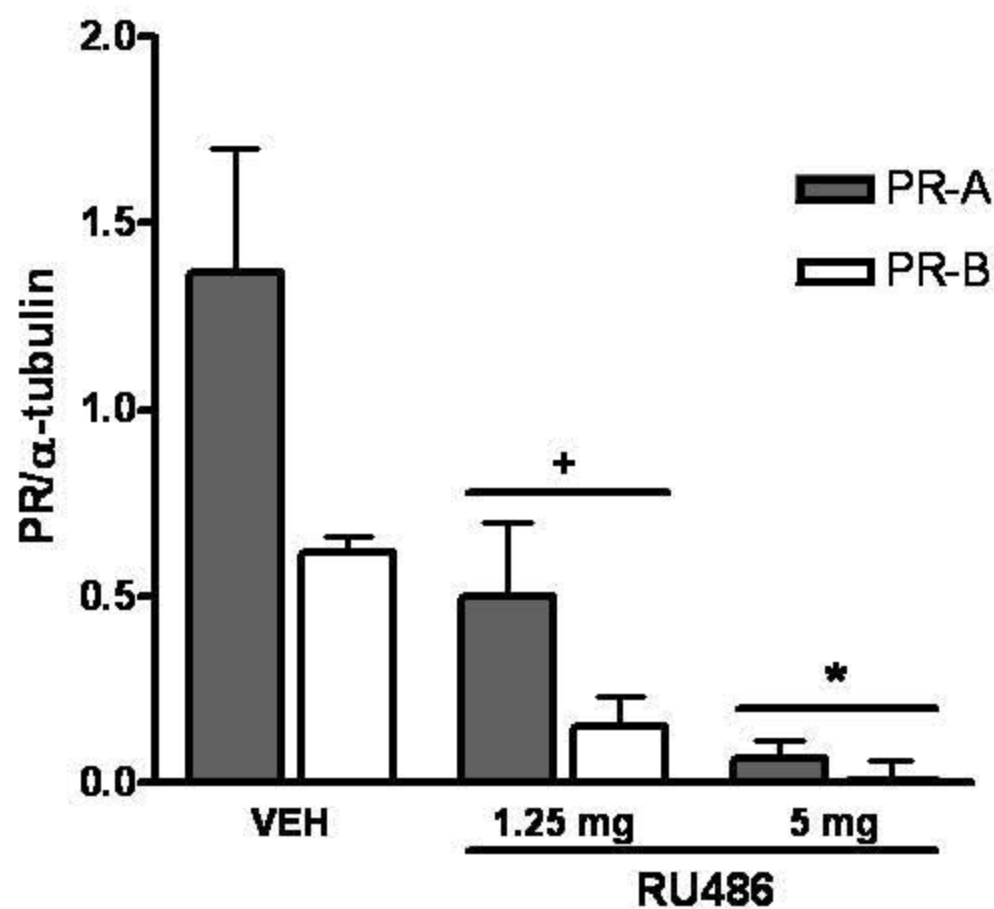
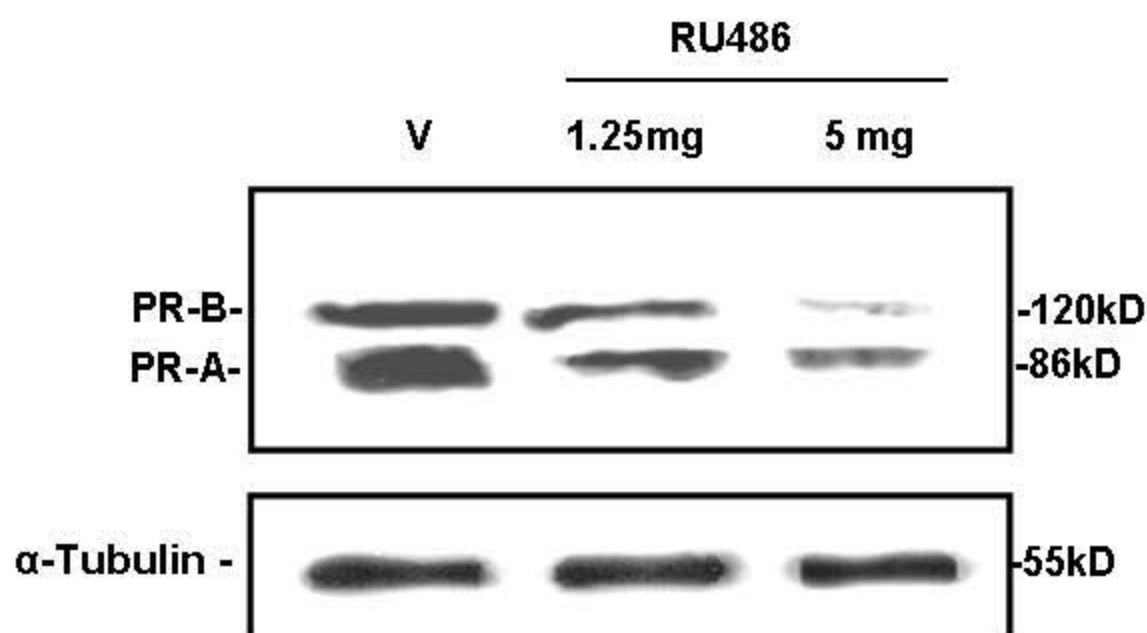


Fig. 2

