



FACULTAD DE CIENCIAS
LABORATORIO DE NEUROQUÍMICA Y NEUROFARMACOLOGÍA
CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA Y PLASTICIDAD CEREBRAL
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA

**LA ADMINISTRACIÓN NEONATAL DE ESTRADIOL VALERATO,
TESTOSTERONA PROPIONATO Y DIHIDROTESTOSTERONA AFECTA LA
CONDUCTA DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA INDUCIDA POR MORFINA EN
LA RATA ADULTA.**

Tesis para optar al título profesional de Químico Farmacéutico

GABRIEL ALEJANDRO ZAMORANO OLEA

Director de Tesis: Dr. Ramón Sotomayor-Zárate

2017

FINANCIAMIENTO

El desarrollo de esta tesis ha sido posible gracias al financiamiento obtenido por el **Proyecto FONDECYT Regular N° 116-0398** del Dr. Ramón Sotomayor-Zárate. Los resultados de esta tesis han sido presentados en el XXXVIII Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Chiloé, Chile.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a innumerables personas que estuvieron conmigo durante este largo camino.

A mis abuelos Víctor, Bertilia, Matilde y René. Que han sido un pilar fundamental para lograr finalizar esta etapa de mi vida.

A mis primos y tíos por su alegría y darme ánimos de seguir adelante.

A mis amigos de mi etapa Universitaria: Luchito, Carito, Mario, Pedro y Carla. Muchas gracias por su amistad y por los buenos momentos compartidos.

Al Tío Pedro y Tía Ruth que me hicieron sentir como uno más de la familia durante mi estadía en Valparaíso.

A mis profesores de la Universidad los cuales fueron muy importantes en mi formación, animándome siempre en creer en mis capacidades.

Al Equipo del Laboratorio de Neuroquímica y Neurofarmacología por su constante apoyo y compromiso, en especial a Vicky por su buena voluntad y constante apoyo para sacar adelante los experimentos.

A mi profesor Tutor Ramón Sotomayor por darme la oportunidad de realizar este trabajo, orientarme en cada momento, y por animarme a seguir adelante cuando no todo salía como se esperaba.

Y por último quisiera dedicar este trabajo a mi familia por todo el esfuerzo empleado en mi formación. A mi padre René por mostrarme el mundo de los medicamentos, a mi madre Cristina por su gran dedicación en mi bienestar personal y educacional, a mi hermano Nicolás por su compañía y comprensión en momentos complicados y a mi hermana Fernanda por iluminarme con sus sabias palabras cuando las necesitaba. Los quiero mucho a todos.

Este trabajo es para ustedes

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	6
1) Circuito de la Recompensa:	6
2) Sistema Opioidérgico Endógeno:	7
3) La Morfina:.....	9
4) Hormonas Sexuales y Efectos Cerebrales:.....	9
4.1) Efectos de las Hormonas Sexuales sobre Circuitos Dopaminérgicos Cerebrales:	10
4.2) Efectos de las Hormonas Sexuales sobre el Sistema Opioidérgico Endógeno:	11
4.3) Concepto de Reprogramación por Hormonas Sexuales:	13
HIPÓTESIS	15
OBJETIVOS	16
1) Objetivo General.....	16
2) Objetivos Específicos	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
1) Animales:	17
2) Reactivos:	17
3) Administración de Aceite de Sésamo, EV, TP y DHT:	18
4) Registro de la Etapa del Ciclo Estral:	18
5) Actividad Locomotora Inducida por Morfina:.....	19
6) Término de las Series Experimentales y Extracción de Órganos Sensibles al Efecto de las Hormonas Sexuales:	21
7) Cálculos y Análisis Estadísticos:	22
RESULTADOS	23
1) Modelo de Estrogenización y Androgenización Neonatal: Curvas de Peso y Parámetros de Función Reproductiva.....	23
2) Modelo de Estrogenización y Androgenización Neonatal: Peso de Tejidos Sensibles a la Acción de Hormonas Sexuales en Ratas Hembras Adultas.	25
3) Modelo de Estrogenización y Androgenización Neonatal: Peso de Tejidos Sensibles a la Acción de Hormonas Sexuales en Ratas Machos Adultas.	27
4) Efectos de la Exposición Neonatal a Hormonas Sexuales sobre la Ciclidad Estral de Ratas Hembras Control y EV.	29
5) Actividad Locomotora Inducida por Morfina en ratas Hembras y Machos Control.	30

6)	Actividad Locomotora Inducida por Morfina en ratas Hembras y Machos EV.	33
7)	Actividad Locomotora Inducida por Morfina en ratas Hembras y Machos TP.	36
8)	Actividad Locomotora Inducida por Morfina en ratas Hembras y Machos DHT.....	38
9)	Actividad Locomotora Acumulativa Basal e Inducida por la Inyección de Morfina en ratas control, EV, TP y DHT: Análisis por Sexo.	41
10)	Actividad Locomotora Acumulativa Basal e Inducida por la Inyección de Salino en ratas control, EV, TP y DHT: Análisis por Sexo.	43
DISCUSIÓN		45
1)	Efectos de la Administración Neonatal de Hormonas Sexuales sobre Tejidos Sensibles:.....	45
1.1)	Efectos en Órganos Sensibles a la Acción de EV, TP y DHT en Hembras:	45
1.2)	Efectos en Órganos Sensibles a la Acción de EV, TP y DHT en Machos	46
2)	Efectos de la Reprogramación Neonatal con Hormonas Sexuales sobre Actividad Locomotora Inducida por Morfina en Ratas Adultas.	47
CONCLUSIONES		51
BIBLIOGRAFÍA		52

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS

FIGURAS

Figura 1: Circuitos Dopaminérgicos en Cerebro de Rata	6
Figura 2: Biosíntesis de Dopamina.....	7
Figura 3: Mecanismo de Accion de Morfina en VTA	8
Figura 4: Protocolo Experimental de Actividad Locomotora (A.L)	20
Figura 5: Ejemplo de Análisis de Video por ANY-MAZE	21

GRÁFICOS

Gráfico 1:	24
Gráfico 2:.....	26
Gráfico 3:.....	28
Gráfico 4:	29
Gráfico 5:.....	32
Gráfico 6:	35
Gráfico 7:.....	37
Gráfico 8:	40
Gráfico 9:	42
Gráfico 10:.....	44

RESUMEN

El concepto “Reprogramming” es definido como la redirección fisiológica de un órgano o tejido debido a un insulto temprano en períodos sensibles del desarrollo. En ese contexto, nuestro laboratorio ha demostrado que la exposición neonatal a Estradiol Valerato (EV) y Testosterona Propionato (TP) aumentan el contenido y liberación de dopamina (DA) en circuitos cerebrales relacionados con la recompensa y la locomoción de ratas machos adultas. También en la literatura se ha demostrado que las hormonas sexuales pueden modular la expresión del receptor μ opioide en diferentes áreas cerebrales de la rata. En este sentido, el objetivo de esta tesis fue evaluar las consecuencias de la exposición neonatal el DPN-1 a Estradiol Valerato (EV: 0,1 mg/50 μ L en aceite de sésamo s.c.), Testosterona Propionato (TP: 1 mg/50 μ L en aceite de sésamo s.c.), Dihidrotestosterona (DHT: 1 mg/50 μ L en aceite de sésamo s.c.) y aceite de sésamo (Control: 50 μ L s.c.), sobre la conducta de actividad locomotora (A.L) inducida por morfina en ratas hembras y machos Sprague-Dawley (DPN 60-62). Este protocolo consistió en medir durante los primeros 30 min la actividad locomotora basal y luego medir la actividad locomotora inducida por la inyección de morfina (3 mg/kg s.c.) o solución salina fisiológica (1 mL/kg s.c.) durante 180 min en ratas adultas.

Nuestros resultados demostraron que en ratas adultas control y tratadas con hormonas sexuales el DPN-1 aumentaron significativamente su actividad locomotora inducida por morfina respecto a la inyección de salino. Además, considerando las diferencias sexuales pudimos observar que ratas hembras adultas control y tratadas con hormonas sexuales el DPN-1 tienen un aumento significativo en la actividad locomotora inducida por morfina

respecto a los machos de los mismos grupos experimentales e inyectados con la droga. Respecto a ratas hembras adultas tratadas el DPN-1 con DHT se observó un aumento en la actividad locomotora inducida por morfina respecto a las ratas hembras control, EV y TP. Por otro lado, en ratas machos adultas tratadas con EV, TP y DHT se observó un aumento de la actividad locomotora inducida por morfina respecto a ratas machos control que recibieron la misma dosis de la droga. Estos resultados nos sugieren que reprogramación neonatal con hormonas sexuales afecta la conducta de actividad locomotora inducida por morfina en la vida adulta de las ratas, posiblemente a una mayor sensibilidad a los efectos farmacológicos de la droga. Una posible explicación que debiera ser explorada en estudios posteriores sería que estas hormonas podrían afectar la expresión del receptor μ opioide en áreas cerebrales implicadas en las conductas motivadas, lo que favorecería un efecto más potente de la droga y una posible mayor vulnerabilidad a conductas tipos adictivas inducidas por morfina.

ABSTRACT

“Reprogramming” is a concept that is defined as the physiological redirection of an organ or tissue due to an early insult in sensitive periods of its development. In this context, our laboratory has demonstrated that neonatal exposure to Estradiol Valerate (EV) and Testosterone Propionate (TP) increases the content and release of dopamine (DA) in brain circuits related to reward and locomotion in adult male rats. Also in the literature, it has been shown that sex hormones can modulate the expression of the μ opioid receptor in different parts of the rat’s brain. In this sense, the objective of this thesis was to evaluate the consequences of the neonatal exposure (PND-1) to Estradiol Valerate (EV: 0.1 mg / 50 μ L in sesame oil s.c.), Testosterone Propionate (TP: 1 mg / 50 μ L in Sesame s.c.), dihydrotestosterone (DHT: 1 mg / 50 μ L in sesame oil s.c.) and sesame oil (Control: 50 μ L s.c.), on morphine-induced behavior of locomotor activity (AL) in female and male Sprague- Dawley rats (PND 60-62). This protocol consisted on measuring the basal locomotor activity during the first 30 minutes and then measuring the morphine-induced locomotor activity (3 mg/kg s.c.) or the physiological saline solution (1 ml/kg s.c.) during 180 mins on the adult rats.

Our results show that adult control rats and treated (PND-1) increase their morphine-induced locomotor activity in regard to their saline injections. In addition, considering the sexual differences we could observe that control and treated (PND-1) adult female rats have a significant increase in their morphine-induced locomotor activity compared with male rats from the same experimental group. Regarding adult female rats treated

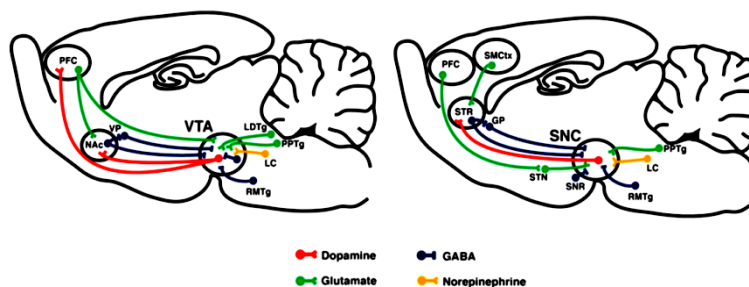
(PND-1) with DHT there was visible increase in their morphine-induced locomotor activity within female EV and TP treated rats. On the other hand, the adult male rats treated with EV, TP and DHT had a significant increase in their morphine-induced locomotor activity in comparison to control male rats that received the same drug doses. These results suggest that neonatal reprogramming with sex hormones affects the behavior of the morphine-induced locomotor activity in the rat's adulthood, possibly to a greater sensitivity to the pharmacological effects of the drug. One possible explanation that should be explored in later studies would be that these hormones could affect the expression of the μ opioid receptor in brain areas involved in the motivated behaviors, which would favor a more potent drug effect and a possible greater vulnerability to addictive behaviors induced by morphine.

INTRODUCCIÓN

1) Circuito de la Recompensa:

El circuito de la recompensa es un circuito neuroanatómico presente en el cerebro de animales que se activa por sensaciones placenteras, tales como el sexo, la comida y la ingesta de líquidos, entre otros [1]. Estos estímulos producen placer a través de la liberación de un neurotransmisor catecolaminérgico llamado dopamina (DA), sintetizada principalmente en el Núcleo Arcuato del Hipotálamo (Sistema tuberoinfundibular), en la Sustancia Nigra *pars compacta* (SN: Sistema Nigroestriatal) y en el Área Tegmental Ventral (VTA: Sistema Mesocorticolímbico) (ver figura 1).

Figura 1

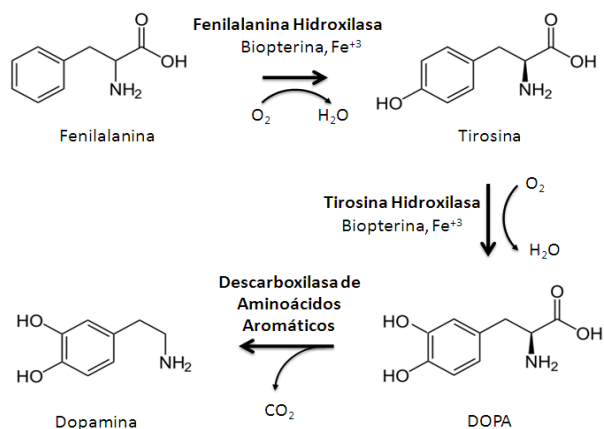


Circuitos Dopaminérgicos en Cerebro de Rata: Vías dopaminérgicas Mesocorticolímbico (A) y Nigroestriatal (B). Figura tomada y adaptada de referencia [2]. Abreviaturas: PFC, corteza prefrontal; NAc, Núcleo Accumbens; VP, pálido ventral; VTA, área tegmental ventral; LDTg, tegmento laterodorsal; PPTg, núcleo pedunculopontino tegmental; LC, locus coeruleus; RMTg, núcleo rostromedial tegmental; SMCtx, cortezasomatosensorial; STR, estriado; GP, globo pálido; STN, núcleo subtalámico; SNC, sustancia nigra compacta; SNR, sustancia nigra reticular.

Estas neuronas dopaminérgicas sintetizan DA a través de diversas reacciones enzimáticas, cuya principal enzima de síntesis es la Tirosina Hidroxilasa (TH) (Figura 2). La DA sintetizada en neuronas dopaminérgicas del VTA es liberada por proyecciones neuronales aferentes que llegan principalmente al Núcleo Accumbens (NAcc) y a la

Corteza Prefrontal (PFC) [3], formando el conocido Circuito de la Recompensa o Mesocorticolímbico. El Circuito Mesocorticolímbico fisiológicamente regula el placer por recompensantes naturales, como el sexo [4] y la comida [5], a través de la liberación de DA en NAcc. Sin embargo, también se ha demostrado que este circuito neuronal es el blanco anatómico de los efectos placenteros de las drogas de abuso [3, 6]. En este sentido, el grupo del Dr. Gaetano Di Chiara (Universidad de Cagliari) ha demostrado en ratas, a través del uso de la técnica de microdiálisis cerebral *in vivo*, que prácticamente todas las drogas abusadas por humanos producen un aumento en la liberación de DA en Nacc y cuerpo estriado (CE) [7].

Figura 2



Biosíntesis de Dopamina

2) Sistema Opioidérgico Endógeno:

El sistema opioidérgico endógeno (SOE) está conformado por receptores opioides y sus ligandos endógenos como las encefalinas, endorfinas y dinorfinas [8], que juegan un importante rol en procesos recompensantes asociados a refuerzos naturales [9, 10]

Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores asociados a proteína $G_{i/o}$, cuya activación inhibe la adenilato ciclasa, disminuye la producción de AMPc y la fosforilación de Proteína Kinasa A [11]. Además, la activación de estos receptores inhibe canales de calcio dependientes de voltaje y estimula canales rectificadores internos de potasio (GIRK), que llevan a la hiperpolarización de células excitables y por ende una reducción en la liberación de neurotransmisores [11].

El receptor μ opioide se expresa ampliamente en áreas del SNC, como neocórtex, estriado, NAcc, VTA, tegumento rostro medial (RMTg), amígdala, tálamo, hipocampo, ventral pallidum, septum, sustancia nigra, colículos inferiores y superiores, locus coeruleus, núcleo del tracto solitario, núcleo espinal del trigémino y asta dorsal de la médula espinal [9]. Este receptor presenta dos isoformas con distinta afinidad por los agonistas μ opioides. El receptor μ -1, es de alta afinidad y asociado a analgesia supraespinal, miosis y euforia, mientras que el receptor μ -2, es de baja afinidad asociado a depresión respiratoria, acciones gastrointestinales y otros efectos sistémicos [12].

Figura 3

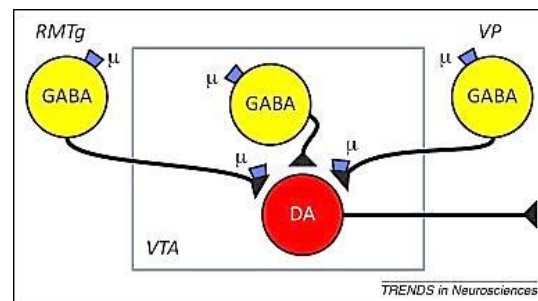


Figura adaptada de [8]. El receptor μ opioide es un receptor metabotrópico acoplado a proteína $G_{i/o}$ que favorece la apertura de canales de potasio y cierre de canales de calcio, llevando a una hiperpolarización de neuronas GABAérgicas del VTA, del Ventral Pálido (VP) y del Tegumento Rostromedial (RMTg). Esta hiperpolarización favorece la activación de neuronas dopaminérgicas que proyectan hacia núcleos límbicos, como el NAcc.

3) **La Morfina:**

La morfina es la droga utilizada en esta tesis para evaluar la conducta de actividad locomotora en ratas adultas control y tratadas con hormonas sexuales. La morfina es un alcaloide fenantrénico aislado del opio (10% de su composición) proveniente de la planta *Papaver somniferum* [12]. Esta droga ha sido utilizada para el tratamiento del dolor moderado a grave, siendo actualmente un fármaco de primera elección para el tratamiento paliativo del dolor crónico atribuido al cáncer [12, 13]. La administración exógena de morfina, activa el sistema de la recompensa, principalmente a través de la estimulación de receptores μ opioides presentes en interneuronas GABAérgicas del VTA lo que favorece la activación de neuronas dopaminérgicas de este núcleo y la liberación de DA en NAcc [14, 15].

4) **Hormonas Sexuales y Efectos Cerebrales:**

Las hormonas sexuales circulantes son producidas principalmente por las gónadas y tienen efectos en diversos tejidos sensibles a su acción debido a que expresan receptores específicos para ellas. Las hormonas sexuales presentan características fisicoquímicas lipofílicas, por este motivo son capaces de cruzar membranas biológicas y ejercer sus efectos a través de receptores citoplasmáticos principalmente [16, 17].

En la hembra la hormona luteinizante (LH) estimula la ovulación y la síntesis de andrógenos en las células de la Teca, mientras que la hormona foliculoestimulante (FSH) estimula la activación de la enzima aromatasa citocromo P450 (CYP19A1) que lleva a la síntesis de estradiol (E_2), a través de la aromatización de la testosterona (T). En machos,

la LH estimula la biosíntesis de T en células Leydig y la FSH estimula la espermatogénesis en las células de Sertoli [18, 19].

Las hormonas sexuales ejercen su acción tanto en tejidos reproductivos como no reproductivos (hígado, hueso, músculo y cerebro) a través de la unión a receptores específicos. Los receptores citoplasmáticos para el E₂ y otros estrógenos (ERs), identificados son ER1 (también conocido como Er α) y ER2 (Er β) [20]. A nivel del sistema nervioso central, los receptores de estrógenos se localizan en diversas áreas cerebrales [16], incluyendo el circuito de la recompensa [21-23]. En el caso de la principal hormona masculina, la T se ha identificado que se une a receptores citoplasmáticos para andrógenos denominados AR [24], mediando un efecto androgénico directo. Sin embargo, la T en tejidos que expresan la enzima CYP19A1 es aromatizada a E₂ ejerciendo efectos mediados por ERs [25]. Por otro lado, la T puede metabolizarse por la CYP P450 5 α -reductasa a Dihidrotestosterona (DHT: un metabolito androgénico más potente y no aromatizable a estrógenos) [26].

4.1) Efectos de las Hormonas Sexuales sobre Circuitos Dopaminérgicos Cerebrales:

Las hormonas sexuales circulantes son capaces de modular el funcionamiento de neuronas dopaminérgicas de los circuitos mesocorticolímbicos y nigroestriatales, entre otros. Por ejemplo, se ha demostrado que en ratas ovariectomizadas (OVX) se produce una disminución de neuronas TH positivas en SN y VTA [27]. Sin embargo, el reemplazo con agentes estrogénicos restablece los niveles normales de expresión de TH en SNpc y VTA [27]. Por otro lado, a nivel periférico se ha demostrado que los disruptores endocrinos con actividad estrogénica como p-nonilfenol y bisfenol-A (BPA) aumentan la

actividad de la TH, llevando a mayor síntesis de catecolaminas en células de médula adrenal bovina [28, 29]. También se ha visto que los estrógenos modulan los niveles del transportador de DA (DAT), la cual es la principal proteína reguladora de los niveles extracelulares de DA. Por ejemplo, la OVX de ratas al día postnatal (DPN-90) produce una reducción significativa de los niveles de DAT en el NAcc [30] medidos por la técnica de autoradiografía. Mientras que el reemplazo con E₂ en estas ratas OVX restituye los niveles normales de DAT [30].

Con respecto a los efectos cerebrales que produce la T, diversos estudios han demostrado que esta hormona sexual regula el número de neuronas dopaminérgicas en el cerebro a través de modular la sobrevivencia celular y la expresión de los fenotipos dopaminérgicos en SNp y VTA [31]. Así por ejemplo en ratas y ratones machos castrados se produce un aumento en el número de neuronas TH positivas en SNp y VTA [31]. Mientras, que el reemplazo con T o DHT restituye los niveles normales de TH en estas mismas áreas cerebrales [31]. Esta y otras evidencias han demostrado que los andrógenos en ratas adultas tendrían un rol neuromodulador negativo sobre la expresión de TH en neuronas dopaminérgicas.

4.2) Efectos de las Hormonas Sexuales sobre el Sistema Opioidérgico Endógeno:

Con respecto a las hormonas sexuales, se ha demostrado que la co-administración de progesterona y E₂ benzoato con morfina en ratas hembras adultas aumenta significativamente la expresión del mRNA del receptor μ opioide en CE de ratas hembras OVX versus ratas hembras control [32]. Además, en estas mismas ratas se demostró utilizando la técnica de inmunoblot un aumento del receptor μ opioide en la misma área

cerebral [32]. También se ha demostrado que el tratamiento con E₂ benzoato aumenta significativamente los niveles de ARNm del receptor μ -opioide en el núcleo ventromedial y núcleo arcuato del hipotálamo en ratas hembras OVX medidos por la técnica de hibridación *in situ* [33]. Además, los niveles elevados de estrógenos después de la administración de E₂ benzoato en ratas hembras OVX aumenta la disponibilidad del receptor μ -opioide en interneuronas GABAérgicas del hipocampo [34]. Por otro lado, se ha demostrado que la OVX induce una disminución significativa de los niveles de β -endorfinas plasmáticas y en áreas cerebrales, como lóbulo frontal, lóbulo parietal, hipocampo, hipotálamo, lóbulo neurointermedio y adenohipófisis [35]. Mientras que el reemplazo hormonal con T y E₂ aumenta significativamente los niveles de β -endorfinas en las áreas cerebrales antes mencionadas y en plasma [35]. Sin embargo, en machos orquiectomizados (OCX) el reemplazo con T y E₂ sólo produce un aumento en los niveles de β -endorfinas en hipotálamo, lóbulo neurointermedio, adenohipófisis y plasma [35].

Respecto a los andrógenos, se ha observado que la administración con TP (1,25 mg s.c.) en ratas hembras el DPN-2, no altera significativamente el número de receptores μ opioides el DPN-60 en hipotálamo respecto ratas hembras control, utilizando estudios de radioligandos con [³H]-Dihidromorfina [36]. Sin embargo, en ratas machos GDX el DPN-2 hubo un incremento del número de receptores μ opioides el DPN-60 en hipotálamo respecto a ratas machos control [36].

A pesar de estos antecedentes el rol que podrían desempeñar las hormonas sexuales en el Sistema Opioidérgico Endógeno en zonas relacionadas con la locomoción y recompensa ha sido poco estudiado.

4.3) Concepto de Reprogramación por Hormonas Sexuales:

El concepto de reprogramación es definido como la redirección fisiológica de un tejido u órgano por efecto de un estímulo o daño en un período sensible del desarrollo fetal o postnatal temprano (neonatal), que provoca cambios funcionales a largo plazo [37]. La importancia de esta definición es que durante el desarrollo existen períodos críticos de vulnerabilidad (ventanas de sensibilidad) para condiciones adversas que pueden redireccionar la fisiología normal de diferentes órganos. En nuestro país el grupo del Dr. Hernán E. Lara demostró en el año 2011 que la administración neonatal de hormonas sexuales, como EV y TP, produce en ratas hembras adultas alteraciones reproductivas y neuroquímicas en el contenido de neurotransmisores en el hipotálamo ventromedial [38].

A nivel neuroquímico, la reprogramación neonatal con hormonas sexuales produce cambios sobre el contenido de neurotransmisores monoaminérgicos en ratas hembras [38, 39] y machos adultos [40]. Por ejemplo, utilizando este modelo se ha observado que la administración neonatal de EV aumenta el contenido de (DA), noradrenalina (NA) y serotonina (5-HT), en áreas hipotalámicas tuberales, como hipotálamo ventromedial y núcleo arcuato [38]. Recientemente nuestro laboratorio demostró que la administración neonatal de EV en ratas hembras y machos adultas produce un aumento en el contenido de DA, NA y 5-HT en SNp-VTA [41]. Además, demostramos que tanto la administración neonatal de EV y TP producen un aumento en el contenido de DA en SN-VTA, relacionado con un aumento de la expresión de TH en estas áreas cerebrales, sin embargo, la administración neonatal de DHT no produjo cambios estadísticamente significativos [41].

Cabe señalar que de manera concomitante el aumento del contenido de DA observado en ratas tratadas con EV y TP, se observó un aumento en la liberación de DA en NAcc inducida por un estímulo depolarizante (K^+ 70 mV) [41]. A pesar de estos antecedentes, estudios de reprogramación neonatal con hormonas sexuales sobre las conductas tipo adictivas inducidas por agonistas de receptores μ opioides no han sido realizados y podrían entregar evidencia valiosa sobre factores de vulnerabilidad para el desarrollo de adicción.

HIPÓTESIS

En base a los antecedentes anteriormente señalados la hipótesis para esta tesis fue la siguiente:

“La administración neonatal de Estradiol Valerato y Testosterona Propionato aumenta la actividad locomotora inducida por morfina en ratas adultas”.

OBJETIVOS

1) **Objetivo General**

Estudiar los efectos de la reprogramación neonatal con hormonas sexuales (EV, TP y DHT) sobre el desarrollo de la hiperlocomoción inducida por morfina en ratas adultas.

2) **Objetivos Específicos**

2.1) Estudiar los efectos de la exposición neonatal a EV (0.1 mg/50µL de aceite de sésamo s.c.), TP (1 mg/50µL de aceite de sésamo s.c.), DHT (1 mg/50µL de aceite de sésamo s.c.) y aceite de sésamo (50µL s.c.) durante las primeras 12 horas de vida postnatal en ratas Sprague-Dawley de ambos sexos, sobre la actividad locomotora inducida por la administración aguda de morfina (3 mg/kg s.c.) en la vida adulta de las ratas. Para dar cumplimiento a este objetivo específico utilizaremos el análisis de videograbaciones usando el programa ANY-Maze™.

2.2) Determinar parámetros morfométricos de tejidos sensibles a la acción de hormonas sexuales una vez eutanasiados los animales. Se eligieron tejidos reproductivos como ovarios, útero, vesícula seminal, testículos e hipófisis, según el sexo de cada animal con el objetivo de verificar la correcta administración neonatal de las hormonas sexuales.

MATERIALES Y MÉTODOS

1) Animales:

Se utilizaron 90 crías de ratas Sprague-Dawley de ambos sexos recién nacidas provenientes de 7 camadas. Todos los animales fueron alojados en una Sala de Mantenición del Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso. Esta sala cuenta con temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) y ciclos de luz día-noche de 12 hr, encendiendo las luces a las 08:00 am. Los animales fueron destetados el DPN-21, desde esta fecha y hasta el final de los experimentos fueron mantenidos con comida (Prolab[®] RMH 3000, LABDIET) y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales realizados en esta tesis fueron aprobados por el Comité de Bioética y de Bioseguridad de la Universidad de Valparaíso y otorgados al Proyecto Fondecyt Regular N° 116-0398 cuyo investigador responsable es el Dr. Ramón Sotomayor-Zárate, director de esta tesis. En ésta tesis, se hicieron todos los esfuerzos para reducir al mínimo el número de animales utilizados y su sufrimiento.

2) Reactivos:

Estradiol Valerato (EV), Testosterona Propionato (TP), Dihidrotestosterona (DHT) y Aceite de Sésamo fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Chile (Importación de Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, Missouri, USA). La Morfina Clorhidrato (10 mg/mL) utilizada en esta tesis fue donada por el Fresenius-Kabi Chile S.A. (San Joaquín, Santiago, Chile).

3) **Administración de Aceite de Sésamo, EV, TP y DHT:**

Las crías se dividieron aleatoriamente por sexo y grupo experimental (Control, EV, TP y DHT). Cada animal fue inyectado durante las primeras 12 hr de vida con EV (0.1 mg de EV disueltos en 50 μ L de aceite de sésamo), TP (1 mg de TP disueltos en 50 μ L de aceite de sésamo), DHT (1 mg de DHT disueltos en 50 μ L de aceite de sésamo) o aceite de sésamo (50 μ L), dependiendo del grupo experimental al que fueron asignados. Cabe señalar que las dosis utilizadas de EV, TP y DHT han sido publicadas previamente por el director de esta tesis [38, 41, 42]. Todas las crías tuvieron lactancia materna hasta el DPN-21. Tras el destete, los animales se alojaron por sexo y grupo tratamiento en jaulas de tamaño estándar cuyas dimensiones fueron 16 cm de alto, 26 cm de ancho y 47 cm de largo (máximo 5 animales por jaula) en la Sala de Mantenimiento de Animales de Experimentación del Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso. Para las ratas hembras de los grupos control y EV se registró la etapa del ciclo estral desde el DPN-40 hasta el DPN 60-62, determinándose a través de análisis microscópico de la proporción de leucocitos, células epiteliales y cornificadas en frotis vaginales diarios, cuya composición es característica de cada fase del ciclo [43].

4) **Registro de la Etapa del Ciclo Estral:**

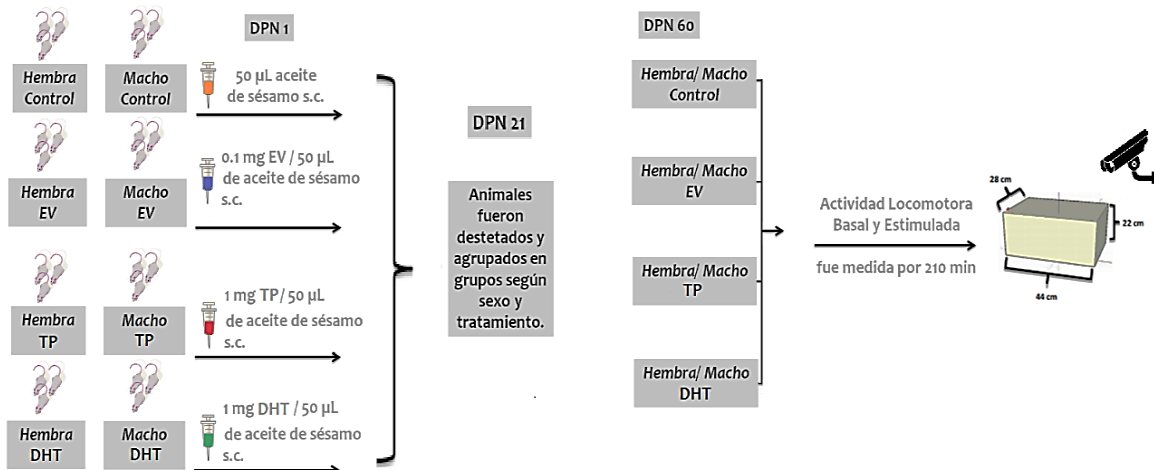
El registro diario de ciclicidad estral fue realizado a contar de la fecha de apertura vaginal de los animales y basados en las características citológicas que adopta el epitelio vaginal por efecto de los niveles circulantes de hormonas sexuales esteroideas y que caracterizan las etapas periovulatorias [43]. Brevemente; Proestro dura entre 12 a 24 horas y citológicamente se caracteriza por la presencia de células epiteliales nucleadas,

bien redondeadas y sólo algunas escamosas de forma irregular. Estro dura entre 24 a 48 horas, es el período de receptividad sexual por el macho y citológicamente se caracteriza por la presencia de células escamosas (con citoplasma granular), de forma irregular y agrupadas. Metaestro (Diestro 1) dura de 12 a 24 horas y se observan leucocitos y células escamosas en el frotis. Diestro 2 dura aproximadamente 48 horas y se observa una alta presencia de leucocitos en el frotis vaginal.

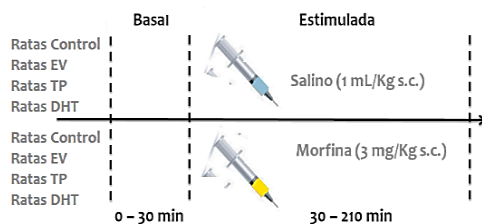
5) Actividad Locomotora Inducida por Morfina:

La actividad locomotora basal e inducida por morfina fue medida en los grupos control, EV, TP y DHT. Cada animal fue colocado en una jaula de prueba (44 de largo x 22 de altura x 28 cm de ancho) y durante los primeros 30 min se registró la actividad locomotora basal. A los 30 minutos, los animales fueron inyectados según tratamiento con una dosis de morfina (3 mg/kg s.c.) o solución salina fisiológica (1 mL/kg s.c.), registrando la actividad locomotora durante 180 min (Figura 4). La actividad locomotora se registró usando cámaras IP (Modelo LX-C202, Seguridad Lynx, China) fijas por encima de la jaula de ensayo y conectadas por Wireless a un computador en otra habitación. Los videos se analizaron con el programa ANY-Maze™ (Stoelting Co., IL, EE.UU.) bajo licencia adquirida por la Dra. Georgina M. Renard (Figura 5). Las jaulas de ensayo fueron limpiadas y desinfectadas con una solución de etanol al 5% v/v después de cada ensayo.

Figura 4

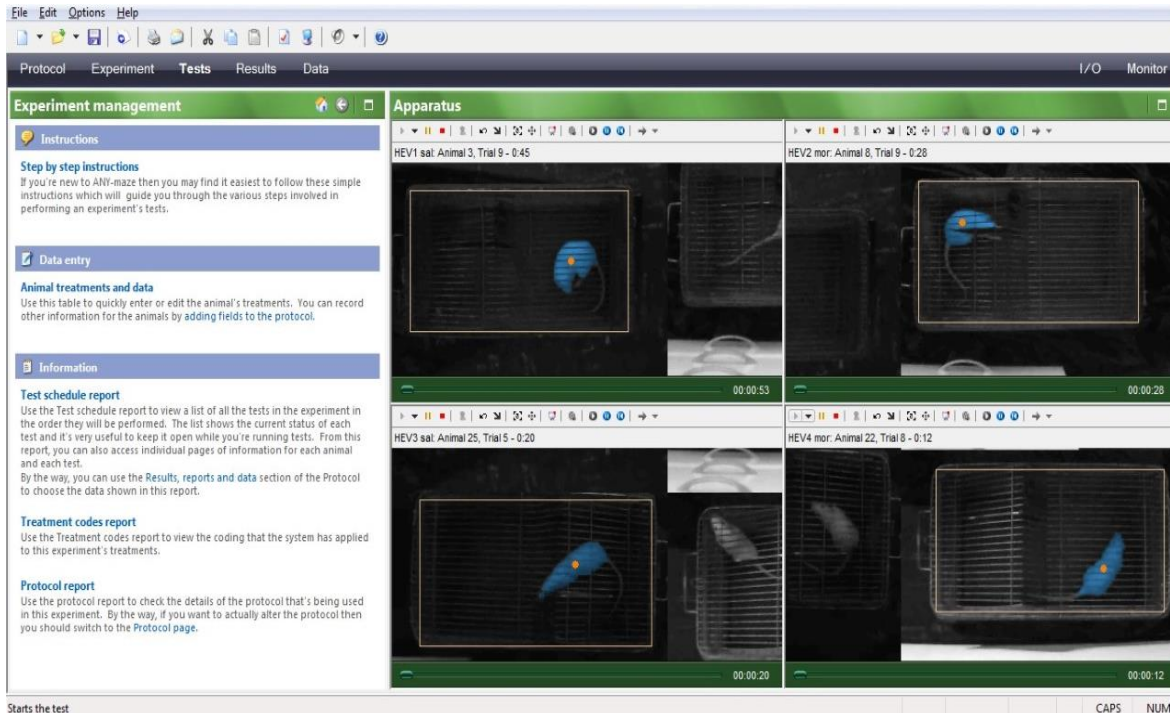


Protocolo de Actividad Locomotora



Esquema del protocolo experimental utilizado en esta tesis. Ratas hembras y machos fueron tratados con aceite de sésamo (50 μ L s.c.), EV (0,1 mg/50 μ L ac. sésamo s.c.), TP (1 mg/50 μ L ac. sésamo s.c.) o DHT (1 mg/50 μ L ac. sésamo s.c.) el primer día de nacimiento (DPN-1). Luego el DPN-21 fueron destetados y el DPN 60-62 se realizó la Actividad Locomotora inducida por salino (1 mL/kg s.c.) o morfina (3 mg/kg s.c.).

Figura 5



Ejemplo del análisis de videograbaciones de actividad locomotora. ANY-MAZE™ ajusta proporcionalmente las dimensiones reales de la caja (44 cm de largo y 28 cm de ancho) y detecta la distancia recorrida en base al movimiento del contraste de color de la rata (blanco) respecto a su entorno (negro).

6) Término de las Series Experimentales y Extracción de Órganos Sensibles al Efecto de las Hormonas Sexuales:

Una vez finalizado el Test, los animales fueron eutanasiados por decapitación con guillotina para animales menores (Modelo 51330, Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) el DPN 60-62 para realizar la extracción de los tejidos sensibles al efecto de hormonas sexuales. En las ratas hembras se extrajeron el ovario izquierdo, el útero e hipófisis, mientras que en ratas machos se extrajeron el testículo izquierdo, vesícula seminal e hipófisis. Todos los tejidos fueron pesados en una balanza analítica (Modelo JK-180, Chyo, Japón) y sus pesos registrados para cada animal.

7) Cálculos y Análisis Estadísticos:

Los datos fueron expresados como valor promedio \pm error estándar medio (EEM). Se utilizó análisis ANOVA de dos vías para determinar eventuales diferencias significativas entre las curvas de pesos (Gráfico 1) y para estudiar la actividad locomotora de curso temporal de los animales de cada grupo experimental (Gráficos 5, 6, 7, 8; Paneles A y B). Se utilizó análisis ANOVA de una vía seguido con un post-test LSD-Fisher para analizar eventuales diferencias estadísticas en el peso de órganos sensibles a la acción de hormonas sexuales entre los grupos experimentales (Gráficos 2 y 3) y para analizar la actividad locomotora acumulativa (Gráficos 5, 6, 7, 8; Paneles C y Gráfico 9). Todos los análisis estadísticos anteriormente mencionados y el diseño de gráficos fueron realizados con el programa GraphPad Prism v6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTADOS

1) Modelo de Estrogenización y Androgenización Neonatal: Curvas de Peso y Parámetros de Función Reproductiva.

A cada animal de las series experimentales le fue registrado su peso corporal para establecer curvas de crecimiento que pudiesen ser comparadas por sexo y tratamiento neonatal. En este sentido, encontramos diferencias estadísticamente significativas en las curvas de peso entre los grupos experimentales por sexo (Gráfico 1, Panel A y B).

El análisis de varianza ANOVA de dos vías entre ratas hembras control, EV, TP y DHT, mostró diferencias significativas al comparar las curvas de peso entre ratas hembras control y EV (Interacción: $[F_{(41,872)}=4,209; P<0,0001]$; Tratamiento: $[F_{(1,872)}=453,2; P<0,0001]$; Tiempo: $[F_{(41,872)}=801,0; P<0,0001]$) y entre ratas hembras control y TP (Interacción: $F_{(41,788)}=9,612; P<0,0001]$; Tratamiento: $[F_{(1,788)}=952,7; P<0,0001]$; Tiempo: $[F_{(41,788)}=1167; P<0,0001]$). Sin embargo, no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre ratas hembras control y DHT (Interacción: $[F_{(41,695)}=1,777; P=0,0024]$; Tratamiento: $[F_{(1,695)}=3,232; P=0,0727]$; Tiempo: $[F_{(41,695)}=1407; P<0,0001]$).

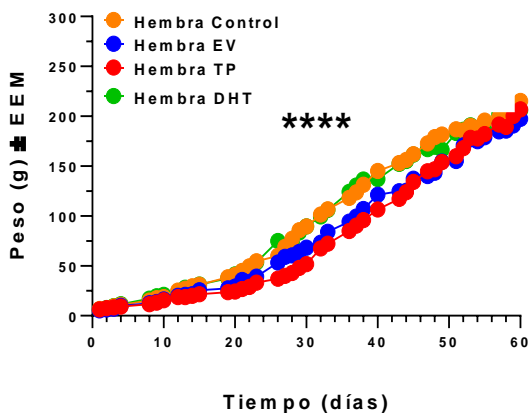
El análisis de varianza ANOVA de dos vías entre ratas machos control, EV, TP y DHT mostró diferencias significativas al comparar las curvas de peso entre ratas machos control y EV (Interacción: $[F_{(32,792)}=16,32; P<0,0001]$; Tratamiento: $[F_{(1,792)}=294,8; P<0,0001]$; Tiempo: $[F_{(32,792)}=623,3; P<0,0001]$), entre ratas machos control y TP (Interacción: $[F_{(32,693)}=4,424; P<0,0001]$; Tratamiento: $[F_{(1,693)}=128,8; P<0,0001]$; Tiempo: $[F_{(32,693)}=607,8; P<0,0001]$), y entre ratas machos control y DHT (Interacción:

[$F_{(32,93)}=4,379$; $P<0,0001$]; Tratamiento: [$F_{(1,693)}=19,84$; $P<0,0001$]; Tiempo: [$F_{(32,693)}=700,6$; $P<0,0001$]).

Gráfico 1:

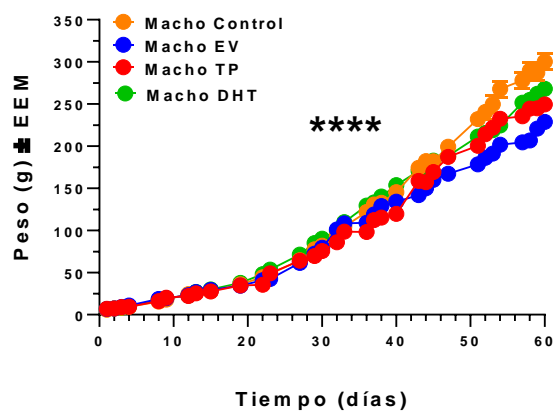
A

Curva Peso Hembras



B

Curva Peso Machos



Ganancia de peso de grupos de ratas hembras tratadas el DPN-1 con aceite de sésamo, EV, TP y DHT (A), y la ganancia de peso de grupos de ratas machos tratadas el DPN-1 con aceite de sésamo, EV, TP y DHT. Ratas hembras control n=10, hembras EV n=13, hembras TP n=11, hembras DHT n=10, machos control n=13, machos EV n=13, machos TP n=10, machos DHT n=10. El análisis de varianza de dos vías ANOVA desde DPN-1 al DPN-60, muestra diferencias significativas en interacción, tratamiento y tiempo en ratas hembras control vs hembras EV (**** $P<0,0001$), en hembras control vs hembras TP (**** $P<0,0001$), en ratas hembras EV vs hembras TP (**** $P<0,0001$), y en ratas hembras TP vs hembras DHT. (**** $P<0,0001$). Además, se muestra diferencias significativas en interacción, tratamiento y tiempo en ratas machos control vs machos EV (**** $P<0,0001$), en machos control vs machos TP (**** $P<0,0001$), en ratas machos EV vs machos TP (**** $P<0,0001$), y en ratas machos TP vs machos DHT. (**** $P<0,0001$).

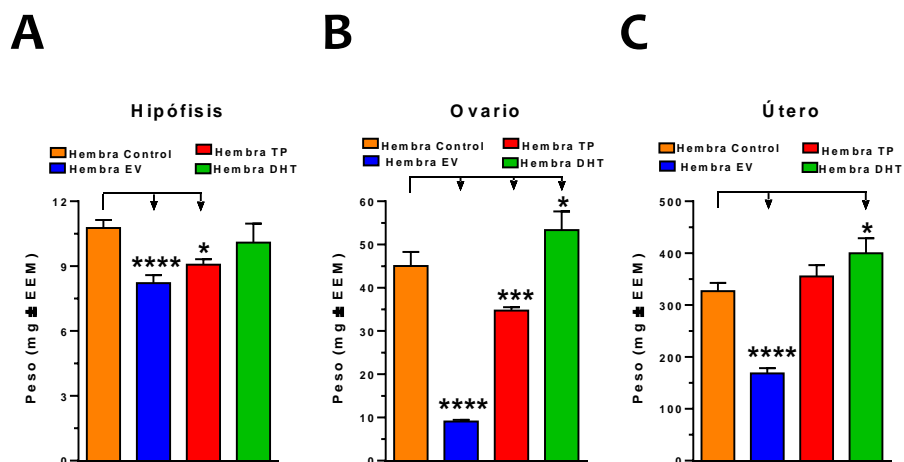
2) Modelo de Estrogenización y Androgenización Neonatal: Peso de Tejidos Sensibles a la Acción de Hormonas Sexuales en Ratas Hembras Adultas.

La administración neonatal de EV, TP y DHT produjo cambios en el peso de tejidos sensibles a la acción de las hormonas sexuales, como ovario, útero e hipófisis de ratas hembras adultas (Gráfico 2). Respecto al peso de la hipófisis (Gráfico 2, Panel A), se observó una disminución estadísticamente significativa en ratas hembras EV ($8,2 \pm 0,4$ mg) ($[F_{(3,38)}=7,26; P<0,0001]$) y en ratas hembras TP ($9,1 \pm 0,2$ mg) ($[F_{(3,38)}=7,26; P=0,0001]$), versus ratas hembras control ($10,8 \pm 0,4$ mg).

Respecto al peso del ovario izquierdo (Gráfico 2, Panel B), se observó una disminución significativa del peso de esta gónada en ratas hembras EV ($9,1 \pm 0,4$ mg) ($[F_{(3,36)}=93,17; P<0,0001]$) y ratas hembras TP ($34,7 \pm 0,8$ mg) ($[F_{(3,36)}=93,17; P=0,0007]$) versus ratas hembras control ($45,0 \pm 3,2$ mg). En ratas hembras DHT se observó un aumento estadísticamente significativo ($53,3 \pm 4,3$ mg) ($[F_{(3,36)}=93,17; P=0,0328]$) versus ratas hembras control.

Respecto al peso del útero (Gráfico 2, Panel C), se observó una disminución estadísticamente significativa en ratas hembras EV ($168,2 \pm 10,2$ mg) ($[F_{(3,39)}=36,93; P<0,0001]$) versus ratas hembras control ($326,7 \pm 16,0$ mg). Sin embargo, en ratas hembras DHT ($399,8 \pm 28,98$ mg) ($[F_{(3,39)}=36,93; P=0,0120]$) se observó un aumento estadísticamente significativo versus ratas hembras control.

Gráfico 2:



Peso de la hipófisis (A), ovario izquierdo (B) y del útero (C) el DPN 60-62 de ratas hembras control y ratas hembras expuestas el DPN-1 a hormonas sexuales (EV, TP y DHT). (Control n=10, EV n=13, TP n=11, DHT n=10) El análisis de varianza ANOVA de una vía seguido de un post- test LSD-Fisher. (****P<0,0001; ***P<0,001; *P<0,05).

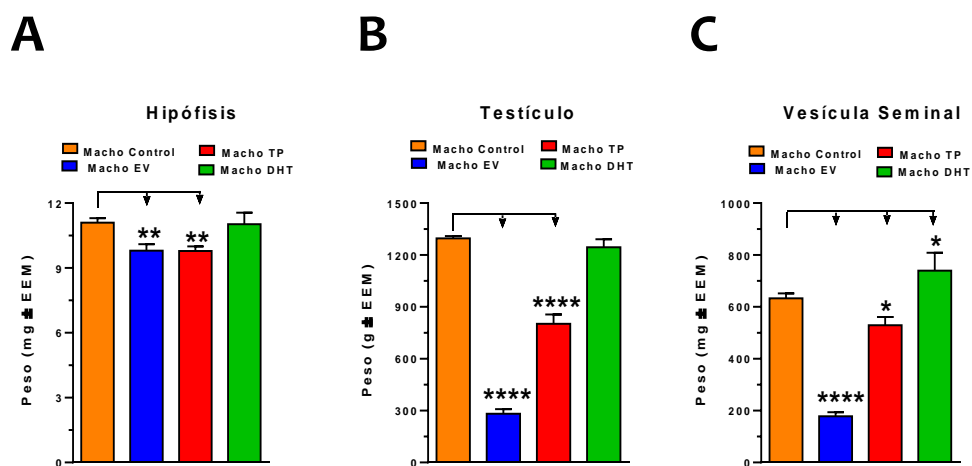
3) **Modelo de Estrogenización y Androgenización Neonatal: Peso de Tejidos Sensibles a la Acción de Hormonas Sexuales en Ratas Machos Adultas.**

La administración neonatal de EV, TP y DHT produjo cambios en el peso de tejidos sensibles a la acción de las hormonas sexuales, como testículo, vesícula seminal e hipófisis en machos (Gráfico 3). Respecto al peso de la hipófisis (Gráfico 3, Panel A), se observó una disminución significativa en ratas machos EV ($9,8 \pm 0,3$ mg) ($[F_{(3,42)}=5,635; P=0,0027]$), ratas machos TP ($9,8 \pm 0,2$ mg) ($[F_{(3,42)}=5,635; P=0,0043]$), respecto a ratas machos control ($11,1 \pm 0,2$ mg).

Respecto al peso del testículo izquierdo (Gráfico 3, Panel B), se observó una disminución estadísticamente significativa de las ratas machos EV ($281,7 \pm 26,9$ mg) ($[F_{(3,36)}=327,1; P<0,0001]$) y ratas machos TP ($801,6 \pm 54,2$ mg) ($[F_{(3,36)}=327,1; P<0,0001]$), versus ratas machos control ($1244 \pm 46,3$ mg).

Respecto al peso de la vesícula seminal (Gráfico 3, Panel C), se observó una disminución significativa en ratas machos EV ($178,2 \pm 15,4$ mg) ($[F_{(3,43)}=55,40; P<0,0001]$) y ratas machos TP ($529,0 \pm 31,9$ mg) ($[F_{(3,43)}=55,40; P=0,0300]$), respecto a ratas machos control ($632,8 \pm 19,2$ mg). Sin embargo, en ratas machos DHT se observó un aumento estadísticamente significativo en el peso de la vesícula seminal ($739,2 \pm 69,3$ mg) ($[F_{(3,43)}=55,40; P=0,0312]$), respecto ratas machos control.

Gráfico 3:

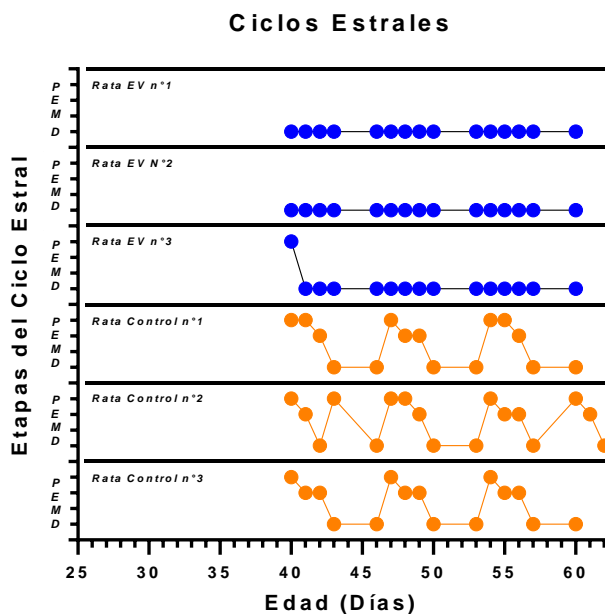


Pesos de la hipófisis (A), testículo izquierdo (B) y vesícula seminal (C) el DPN 60-62 de ratas machos control y ratas machos expuestas el DPN-1 a hormonas sexuales (EV, TP y DHT). (Control n=13, EV n=13, TP n=10, DHT n=10). El análisis de varianza ANOVA de una vía seguido de un post test- LSD-Fisher. (****P<0,0001; **P<0,01; *P<0,05).

4) Efectos de la Exposición Neonatal a Hormonas Sexuales sobre la Ciclicidad Estral de Ratras Hembras Control y EV.

La actividad cíclica estral es otro parámetro que cambia con la administración neonatal de hormonas sexuales [38, 44], por lo cual, se decidió determinar la ciclicidad estral en ratas hembras control y EV entre el DPN-40 y el DPN 60-62. Al respecto, la administración neonatal de EV produjo una aciclicidad estral (Gráfico 4), que es característica en este tipo de tratamiento. Cabe señalar que en el caso de hembras tratadas con TP y DHT el DPN-1 se apreció una agénesis vaginal, reportada previamente en la literatura [44], impidiendo realizar frotis vaginales durante el periodo que señalado.

Gráfico 4:



Ciclos estrales representativos de 3 ratas hembras control (círculos anaranjados) y de 3 ratas hembras tratadas con EV (círculos azules) desde el DPN-40 al DPN 60-62 (Control n=10, EV n=13). La totalidad de ratas hembras control y ratas hembras EV se encontraban en etapa diestro.

5) **Actividad Locomotora Inducida por Morfina en ratas Hembras y Machos Control.**

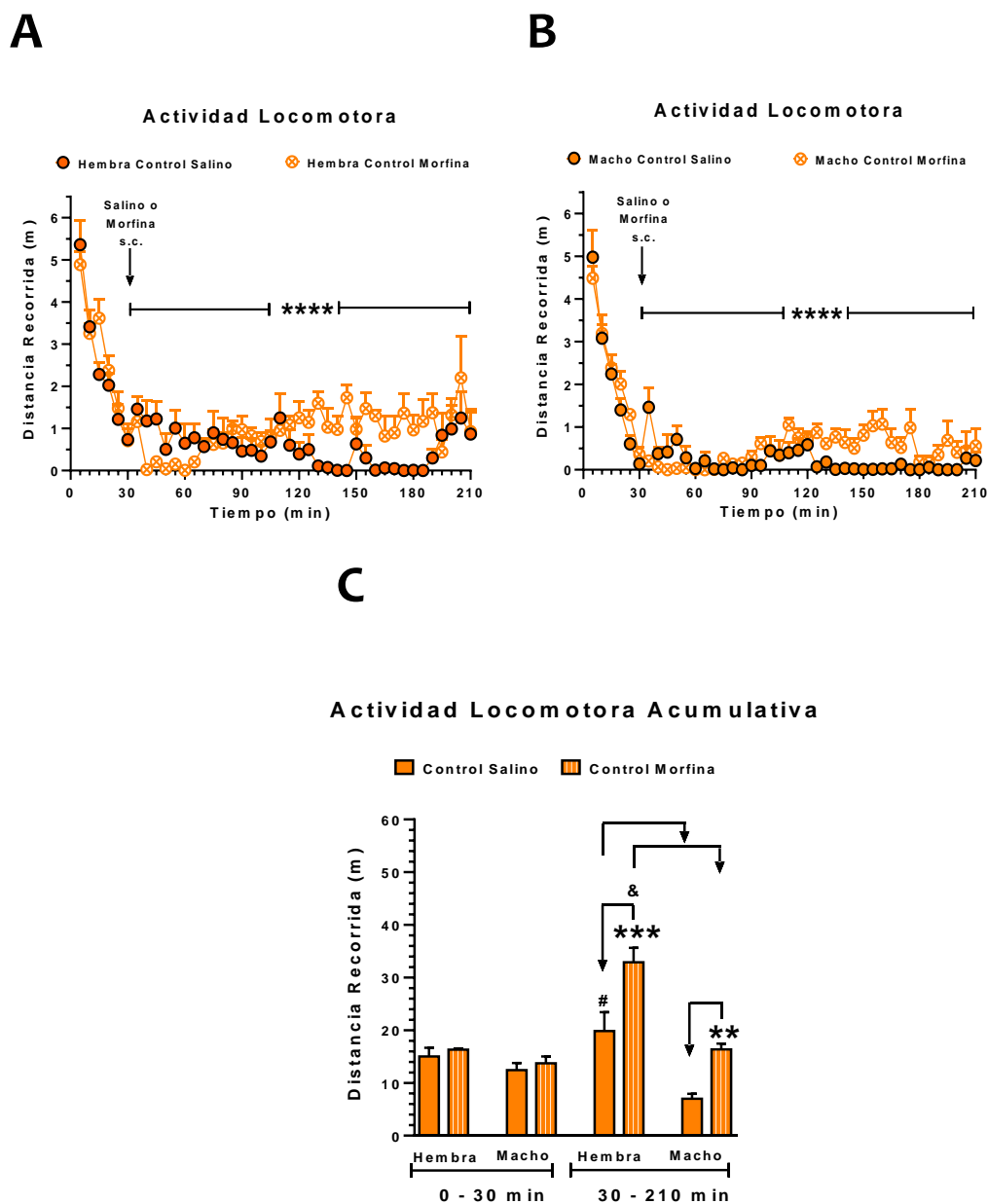
La actividad locomotora expresada como curso temporal cada 5 minutos fue medida en ratas control adultas que recibieron la inyección de aceite de sésamo durante las primeras horas de vida postnatal (Gráfico 5, panel A). Al comparar ratas hembras control tratadas que recibieron inyección de salino (1 mL/kg s.c.) con ratas hembras control que recibieron la inyección de morfina (3 mg/kg s.c.) se observaron en el análisis de ANOVA de dos vías desde los 30 hasta los 210 min diferencias estadísticamente significativas en la locomoción (Interacción: $[F_{(35,288)} = 2,20; P = 0,0002]$; Tratamiento: $[F_{(1,288)} = 18,70; P < 0,0001]$; Tiempo: $[F_{(35,288)} = 1,20; P = 0,2108]$). En ratas machos control (Gráfico 5, Panel B) se observó usando el mismo test estadístico anterior diferencias estadísticamente significativas entre la inyección de salino versus la inyección de morfina (Interacción: $[F_{(35,396)} = 2,67; P < 0,0001]$; Tratamiento: $[F_{(1,396)} = 27,88; P < 0,0001]$; Tiempo: $[F_{(35,396)} = 30,68; P = 0,0044]$).

Al analizar la actividad locomotora acumulativa basal durante los primeros 30 minutos entre ratas hembras control del grupo salino ($15,02 \pm 1,66$ m) y morfina ($16,32 \pm 0,21$ m), y en ratas machos control del grupo salino ($12,44 \pm 1,34$ m) y morfina ($13,73 \pm 1,29$ m) (Gráfico 5, Panel C), no se observaron cambios estadísticamente significativos. Sin embargo, en relación a la actividad locomotora acumulativa inducida por la inyección de salino (1 mL/kg s.c.) y de morfina (3 mg/kg s.c.) desde los 30 a 210 minutos, se observó un aumento estadísticamente significativo de la locomoción acumulativa en ratas hembras control morfina ($32,89 \pm 2,75$ m) versus ratas hembras control salino ($19,83 \pm 3,60$ m) ($[F_{(3,19)} = 24,22; P = 0,0007]$). Similar efecto, se observó en ratas machos control en

la actividad locomotora acumulativa inducida por morfina ($16,36 \pm 1,11$ m) versus ratas machos control salino ($7,00 \pm 0,94$ m) ($[F_{(3,19)} = 24,22; P = 0,0036]$).

Con respecto a las diferencias sexuales en la actividad locomotora inducida por la inyección de salino y morfina (desde los 30 a 210 minutos) se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los sexos. En este sentido, ratas hembras control salino ($19,83 \pm 3,60$ m) tienen una actividad locomotora acumulativa mayor que ratas machos control salino ($7,00 \pm 0,94$ m) ($[F_{(3,19)} = 24,22; P = 0,0005]$). Respecto a la inyección de morfina, también se observó una diferencia sexual, que ratas hembras control morfina ($32,89 \pm 2,75$ m) presentaron una mayor locomoción acumulativa que ratas machos control morfina ($16,36 \pm 1,11$ m) ($[F_{(3,19)} = 24,22; P < 0,0001]$).

Gráfico 5



La Actividad Locomotora de Curso Temporal Basal (0-30 min) y Estimulada (30-210 min) en ratas hembras y machos control (A y B) fue expresada cada 5 minutos y el análisis a través del software ANY-MAZE™ el DPN 60-62 en ratas hembras y machos tratadas con aceite de sésamo (50 μ L s.c.) el DPN-1 y en la adultez tratadas con salino (1 mg/ml s.c.) o morfina (3 mg/kg s.c.) el DPN 60-62. (Análisis estadístico por ANOVA de dos vías 30 a 210 min; Tratamiento (**** p <0,0001)). La actividad locomotora acumulativa basal y estimulada en hembras y machos control (C) fue medida a través del Software ANY-MAZE™ el DPN 60-62. Ratas hembras control salino $n=5$, hembras control morfina $n=5$, machos control salino $n=6$ y machos control morfina $n=7$. Se expresó el promedio \pm EEM. El análisis estadístico se realizó utilizando un ANOVA de una vía post-test LSD-Fisher. (** P <0,001; # P <0,001; & P <0,0001).

6) **Actividad Locomotora Inducida por Morfina en ratas Hembras y Machos EV.**

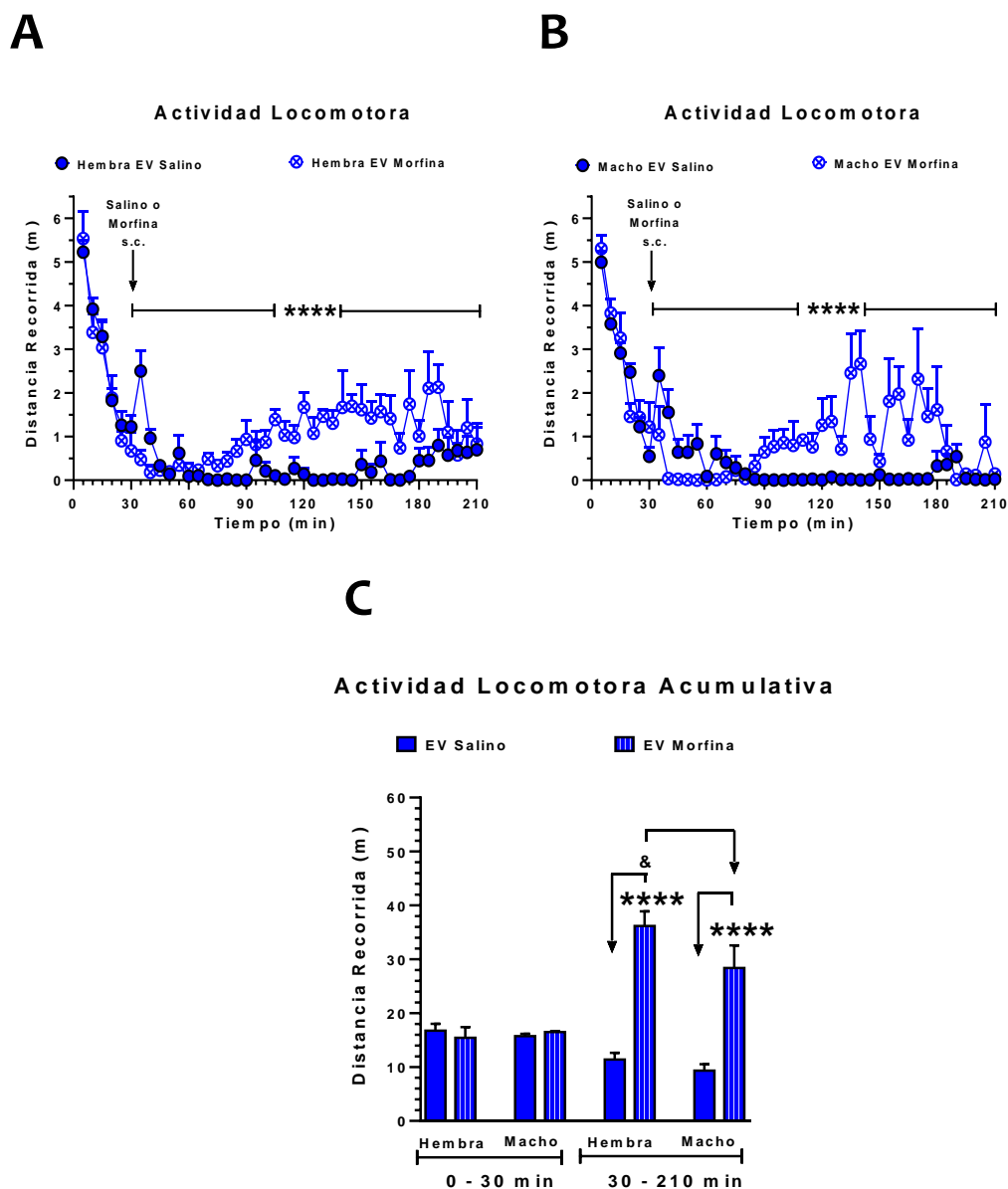
En la actividad locomotora expresada cada 5 minutos (Gráfico 6, Panel A) se observaron diferencias estadísticamente significativas en la locomoción, usando análisis por ANOVA de dos vías desde los 30 a los 210 minutos, cuando comparamos ratas hembras adultas EV inyectadas con salino (1 mL/kg s.c.) versus ratas hembras adultas EV inyectadas con morfina (3 mg/kg s.c.) (Interacción: $[F_{(35,396)}=2,87; P<0,0001]$; Tratamiento: $[F_{(1,396)}=80,39; P<0,0001]$; Tiempo $[F_{(35,396)}=2,19; P=0,0002]$). De igual manera, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ratas machos adultas EV (Gráfico 6, Panel B) tratados con salino versus ratas machos adultas EV inyectadas con morfina (Interacción: $[F_{(35,396)}=4,43; P<0,0001]$; Tratamiento: $[F_{(1,396)}=44,10; P<0,0001]$; Tiempo: $[F_{(35,396)}=2,72; P<0,0001]$) (Gráfico 6, Panel B).

Al analizar la actividad locomotora acumulativa basal durante los primeros 30 minutos (Gráfico 6, Panel C), no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las ratas hembras EV del grupo salino ($16,74 \pm 1,27$ m) versus ratas hembras EV del grupo morfina ($15,41 \pm 2,00$ m) y en ratas machos EV del grupo salino ($15,73 \pm 0,43$ m) versus ratas machos EV del grupo morfina ($16,50 \pm 0,17$ m).

Respecto a la actividad locomotora acumulativa (desde los 30 a los 210 minutos) inducida por la inyección de morfina o salino, se observó un aumento estadísticamente significativo en la locomoción de las ratas hembras EV morfina ($36,17 \pm 2,72$ m) versus ratas hembras EV salino ($11,39 \pm 1,23$ m) ($[F_{(3,22)}=34,34; P<0,0001]$) y en ratas machos EV morfina ($28,38 \pm 4,18$ m) versus ratas machos EV salino ($9,33 \pm 1,20$ m) ($[F_{(3,22)}=34,34; P<0,0001]$).

Con respecto a las diferencias sexuales en la actividad locomotora acumulativa inducida por la inyección de morfina (desde los 30 a los 210 minutos), se observó un aumento estadísticamente significativo en la locomoción de ratas hembras EV morfina ($36,17 \pm 2,72$ m) versus ratas machos EV morfina ($28,38 \pm 4,18$ m) ($[F_{(3,22)}=34,34; P= 0,0341]$).

Gráfico 6



La Actividad Locomotora de Curso Temporal Basal (0-30 min) y Estimulada (30-210 min) en ratas hembras y machos EV (A y B) fue expresada cada 5 minutos y el análisis a través del software ANY-MAZE™ el DPN 60-62 en ratas hembras y machos tratadas con Estradiol Valerato (EV: 0,1 mg/50 µL ac. sésamo s.c.) el DPN-1 y en la adultez tratadas con salino (1 mg/ml s.c.) o morfina (3 mg/kg s.c.) el DPN 60-62. (Análisis estadístico por ANOVA de dos vías 30 a 210 min; Tratamiento (**** $p < 0,0001$)). La Actividad Locomotora Acumulativa Basal y Estimulada en hembras y machos control (C) fueron medidas a través del Software ANY-MAZE™ el DPN 60-62. Ratas hembras EV salino $n=7$, hembras EV morfina $n=6$, machos EV salino $n=8$ y machos EV morfina $n=5$. Se expresó el promedio \pm EEM. El análisis estadístico se realizó utilizando un ANOVA de una vía post-test LSD-Fisher. (**** $P < 0,0001$; & $P < 0,05$).

7) **Actividad Locomotora Inducida por Morfina en ratas Hembras y Machos TP.**

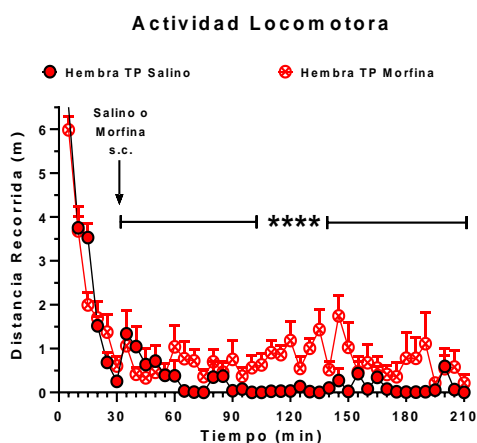
En la actividad locomotora expresada cada 5 minutos (Gráfico 7, Panel A) se observó una diferencia estadísticamente significativa en la locomoción, usando análisis por ANOVA de dos vías desde los 30 a los 210 min, al comparar ratas hembras adultas TP inyectadas con salino (1 mL/kg s.c.) versus ratas hembras adultas TP inyectadas con morfina (3 mg/kg s.c.) (Interacción: $[F_{(35,324)}=1,30; P=0,1294]$; Tratamiento: $[F_{(1,324)}=46,12; P<0,0001]$; Tiempo: $[F_{(35,324)}=1,12; P=0,2971]$) y al comparar ratas machos adultas TP (Gráfico 7, Panel B) inyectadas con salino versus ratas machos adultas TP inyectadas con morfina (Interacción: $[F_{(35,288)}=2,97; P<0,0001]$; Tratamiento: $[F_{(1,288)}=41,26; P<0,0001]$; Tiempo: $[F_{(35,288)}=2,18; P<0,0003]$).

Al analizar la actividad locomotora acumulativa basal durante los primeros 30 minutos (Gráfico 7, Panel C) no se observaron cambios estadísticamente significativos en la locomoción de ratas hembras TP del grupo salino ($16,24 \pm 0,31$ m) versus ratas hembras TP del grupo morfina ($15,33 \pm 0,34$ m) y en ratas machos TP del grupo salino ($12,99 \pm 1,71$ m) versus ratas machos TP del grupo morfina ($15,70 \pm 1,87$ m).

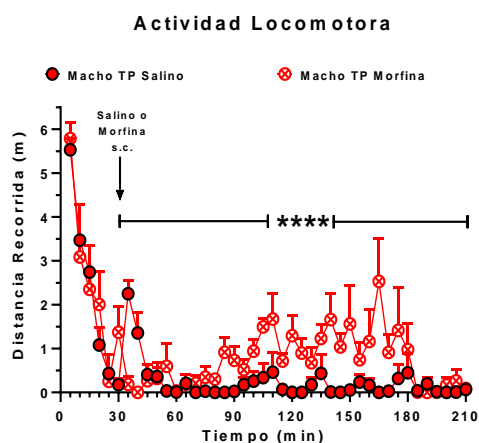
Respecto a la actividad locomotora acumulativa (desde los 30 a los 210 minutos) inducida por la inyección de morfina o salino, se observó un aumento estadísticamente significativo en la locomoción de las ratas hembras TP morfina ($24,92 \pm 4,08$ m) versus ratas hembras TP salino ($7,68 \pm 0,94$ m) ($[F_{(3,18)}=13,91; P=0,0005]$) y en ratas machos TP morfina ($27,04 \pm 3,38$ m) versus ratas machos TP salino ($7,47 \pm 1,37$ m) ($[F_{(3,18)}=13,91; P=0,0001]$).

Gráfico 7

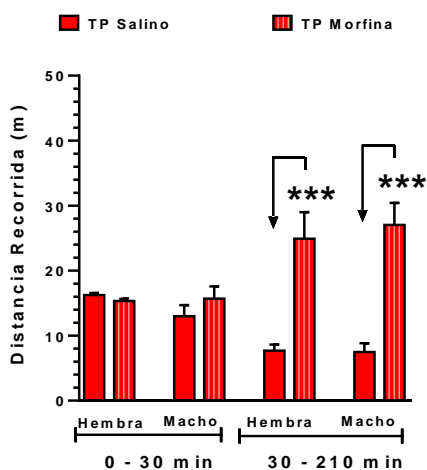
A



B



C

Actividad Locomotora Acumulativa

La Actividad Locomotora de Curso Temporal Basal (0-30 min) y Estimulada (30-210 min) en ratas hembras y machos TP (A y B) fue expresada cada 5 minutos y el análisis a través del software ANY-MAZE™ el DPN 60-62 en ratas hembras y machos tratadas con Testosterona Propionato (TP: 1 mg/50 μ L ac. sésamo s.c.) el DPN-1 y en la adultez tratadas con salino (1 mg/ml s.c.) o morfina (3 mg/kg s.c.) el DPN 60-62. (Análisis estadístico por ANOVA de dos vías 30 a 210 min; tratamiento (**** p <0,0001)). La Actividad Locomotora Acumulativa Basal y Estimulada en hembras y machos TP (C) fue medida a través del Software ANY-MAZE™ el DPN 60-62. Ratas hembras TP salino $n=5$, hembras TP morfina $n=6$, machos TP salino $n=5$ y machos TP morfina $n=5$. Se expresó el promedio \pm EEM. El análisis estadístico se realizó utilizando un ANOVA de una vía post-test LSD-Fisher. (** P <0,001).

8) **Actividad Locomotora Inducida por Morfina en ratas Hembras y Machos DHT.**

En la actividad locomotora expresada cada 5 minutos (Gráfico 8, Panel A) se observó una diferencia estadísticamente significativa en la locomoción, usando análisis por ANOVA de dos vías desde los 30 a los 210 min, al comparar ratas hembras adultas DHT inyectadas con salino (1 mL/kg s.c.) versus ratas hembras adultas DHT inyectadas con morfina (3 mg/kg s.c.) (Interacción: $[F_{(35,288)}=1,58; P=0,0240]$; Tratamiento: $[F_{(1,288)}=78,75; P<0,0001]$; Tiempo: $[F_{(35,288)}=0,72; P=0,8828]$) y al comparar ratas machos adultas DHT (Gráfico 8, Panel B) inyectadas con salino versus ratas machos adultas DHT tratadas con morfina (Interacción: $[F_{(35,288)}=3,60; P<0,0001]$; Tratamiento: $[F_{(1,288)}=36,84; P<0,0001]$; Tiempo: $[F_{(35,288)}=1,73; P=0,0087]$).

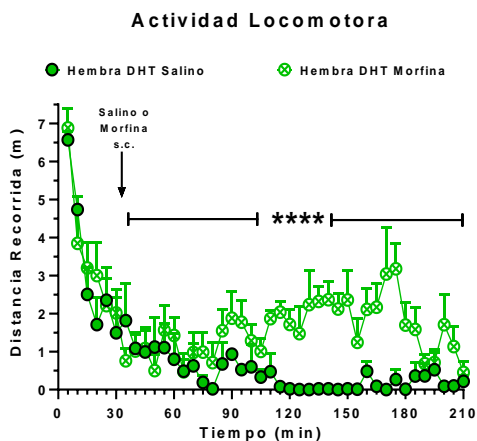
Al analizar la actividad locomotora acumulativa basal durante los primeros 30 minutos (Gráfico 8, Panel C) no se observaron cambios estadísticamente significativos en la locomoción de ratas hembras DHT del grupo salino ($18,86 \pm 1,83$ m) versus ratas hembras DHT del grupo morfina ($21,16 \pm 3,05$ m) y de ratas machos DHT del grupo salino ($15,63 \pm 1,54$ m) versus ratas machos DHT del grupo morfina ($13,32 \pm 1,27$ m).

Respecto a la actividad locomotora acumulativa (desde los 30 a los 210 minutos) inducida por la inyección de morfina o salino, se observó un aumento estadísticamente significativo en la locomoción de las ratas hembras DHT morfina ($55,15 \pm 6,62$ m) versus ratas hembras DHT salino ($22,21 \pm 4,36$ m) ($[F_{(3,16)}=19,53; P=0,0001]$) y en ratas machos DHT morfina ($25,13 \pm 1,49$ m) versus ratas machos DHT salino ($10,92 \pm 1,46$ m) ($[F_{(3,16)}=19,53; P=0,0410]$).

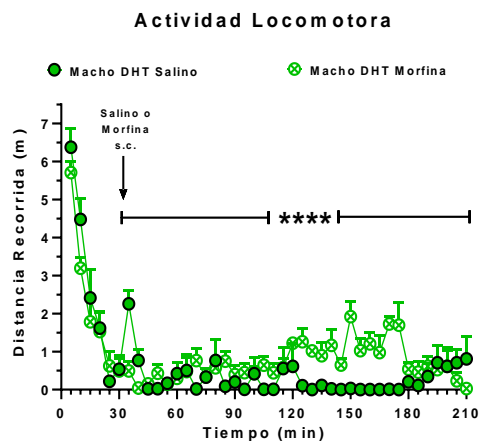
Con respecto a las diferencias sexuales en la actividad locomotora acumulativa inducida por la inyección de morfina (desde los 30 a los 210 minutos), se observó un aumento estadísticamente significativo en la locomoción de ratas hembras DHT morfina ($55,15 \pm 6,62$ m) versus ratas machos DHT morfina ($25,13 \pm 1,49$ m) ($[F_{(3,16)}=19,53; P= 0,0002]$).

Gráfico 8

A

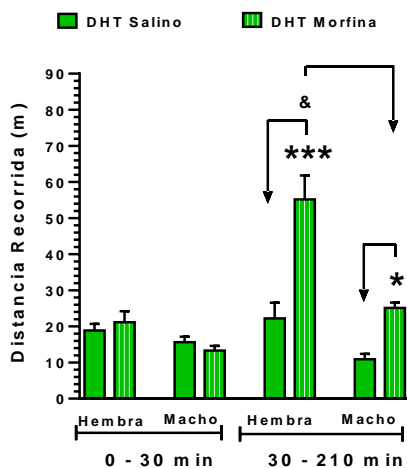


B



C

Actividad Locomotora Acumulativa



La Actividad Locomotora de Curso Temporal Basal (0-30 min) y Estimulada (30-210 min) en ratas hembras y machos DHT (A y B) fue expresada cada 5 minutos y el análisis a través del software ANY-MAZE™ el DPN 60-62 en ratas hembras y machos tratadas con Dihidrotestosterona (DHT: 1 mg/50 µL ac. sésamo s.c.) el DPN-1 y en la adultez tratadas con salino (1 mg/mL s.c.) o morfina (3 mg/kg s.c.) el DPN 60-62. (Análisis estadístico por ANOVA de dos vías 30 a 210 min; tratamiento (**** $p < 0,0001$)). La Actividad Locomotora Acumulativa Basal y Estimulada en hembras y machos DHT (C) fue medida a través del Software ANY-MAZE™ el DPN 60-62. Ratas hembras DHT salino $n=4$, hembras DHT morfina $n=6$, machos DHT salino $n=5$ y machos DHT morfina $n=5$. Se expresó el promedio \pm EEM. El análisis estadístico se realizó utilizando un ANOVA de una vía post-test LSD-Fisher. (*** $P < 0,001$; * $P < 0,05$; & $P < 0,001$).

9) **Actividad Locomotora Acumulativa Basal e Inducida por la Inyección de Morfina en ratas control, EV, TP y DHT: Análisis por Sexo.**

Hembras: Al analizar la actividad locomotora acumulativa basal durante los primeros 30 minutos del protocolo experimental (Gráfico 9), se observó que no hubo cambios estadísticamente significativos en la locomoción basal entre las ratas hembras control ($16,32 \pm 0,21$ m), EV ($15,41 \pm 2,00$ m), TP ($15,33 \pm 0,34$ m) y DHT ($21,16 \pm 3,05$ m) que iban a recibir la inyección de morfina.

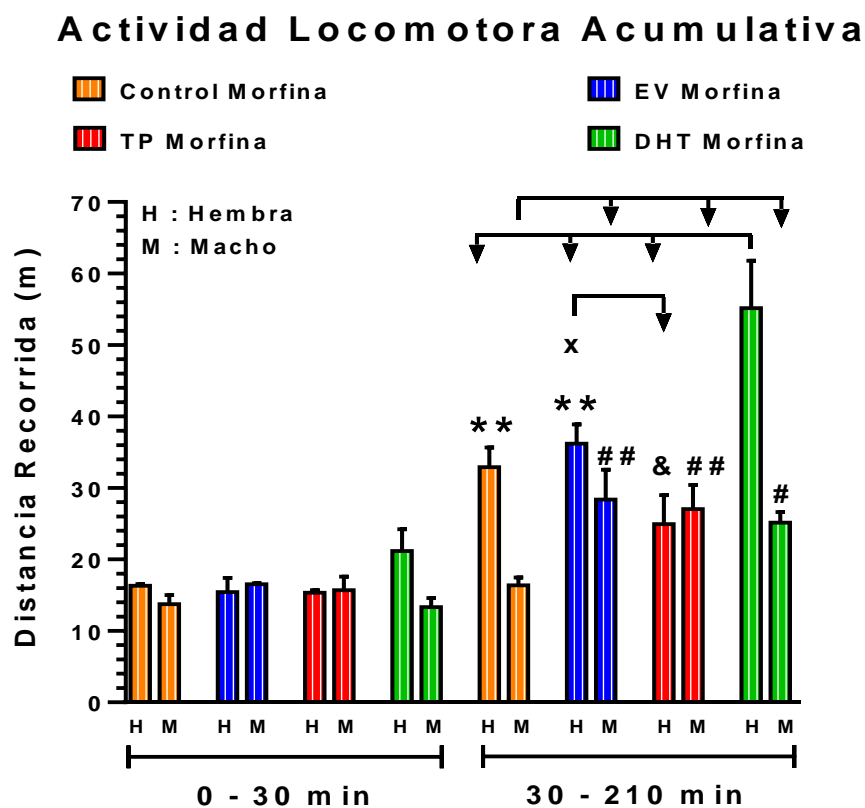
Respecto a la actividad locomotora acumulativa medida entre los 30 a 210 minutos e inducida por morfina (3 mg/kg s.c.) se observó que las ratas hembras DHT que recibieron la inyección de la droga ($55,15 \pm 6,63$ m) tuvieron un aumento significativo en la locomoción respecto a ratas hembras control ($32,89 \pm 2,75$ m) ($[F_{(3,19)}=8,497; P=0,0028]$), ratas hembras EV ($36,17 \pm 2,72$ m) ($[F_{(3,19)}=8,497; P=0,0064]$) y ratas hembras TP ($24,92 \pm 4,08$ m) ($[F_{(3,19)}=8,497; P=0,0001]$). Adicionalmente, se observó un aumento estadísticamente significativo en la actividad locomotora de ratas hembras EV ($36,17 \pm 2,72$ m) versus ratas hembras TP ($24,92 \pm 4,08$ m) ($[F_{(2,14)}=3,204; P=0,0270]$) (Gráfico 9).

Machos: Al analizar la actividad locomotora acumulativa basal durante los primeros 30 minutos del protocolo experimental (Gráfico 9), se observó que no hubo cambios estadísticamente significativos en la locomoción basal entre las ratas machos control ($13,73 \pm 1,29$ m), EV ($16,50 \pm 0,17$ m), TP ($14,85 \pm 1,40$ m) y DHT ($13,32 \pm 1,27$ m) que iban a recibir la inyección de morfina.

Respecto a la actividad locomotora acumulativa medida entre los 30 a 210 minutos e inducida por morfina (3 mg/kg s.c.) se observó que las ratas machos EV ($28,38 \pm 4,18$ m)

($[F_{(3,18)}=4,918; P=0,0035]$), ratas machos TP ($27,04 \pm 3,38$ m) ($[F_{(3,18)}=4,918; P=0,0080]$) y ratas machos DHT ($25,13 \pm 1,49$ m) ($[F_{(3,18)}=4,918; P=0,0248]$) tuvieron un aumento significativo en la locomoción respecto a ratas machos control ($16,36 \pm 1,11$ m) (Gráfico 9).

Gráfico 9



La Actividad Locomotora de Curso Temporal Basal (0-30 min) y Estimulada (30-210 min) por morfina (3mg/kg s.c.) en hembras y machos, medidas a través del Software ANY-MAZE™ entre el DPN 60-62. Ratas hembras control morfina n=5, hembras EV morfina n=6, hembras TP morfina n=6, hembras DHT morfina n=6, machos control morfina n=7, machos EV morfina n=5, machos TP morfina n=5, machos DHT morfina n=5. Se expresó el promedio \pm EEM. El análisis estadístico se realizó utilizando un ANOVA de una vía post-test LSD-Fisher. (** $P < 0,01$; # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; & $P < 0,001$; x $P < 0,05$).

10) Actividad Locomotora Acumulativa Basal e Inducida por la Inyección de Salino en ratas control, EV, TP y DHT: Análisis por Sexo.

Hembras: Al analizar la actividad locomotora acumulativa basal durante los primeros 30 minutos del protocolo experimental (Gráfico 10), se observó que no hubo cambios estadísticamente significativos en la locomoción basal entre las ratas hembras control ($15,02 \pm 1,66$ m), EV ($16,74 \pm 1,27$ m), TP ($16,24 \pm 0,31$ m) y DHT ($18,86 \pm 1,83$ m) que iban a recibir la inyección de Salino.

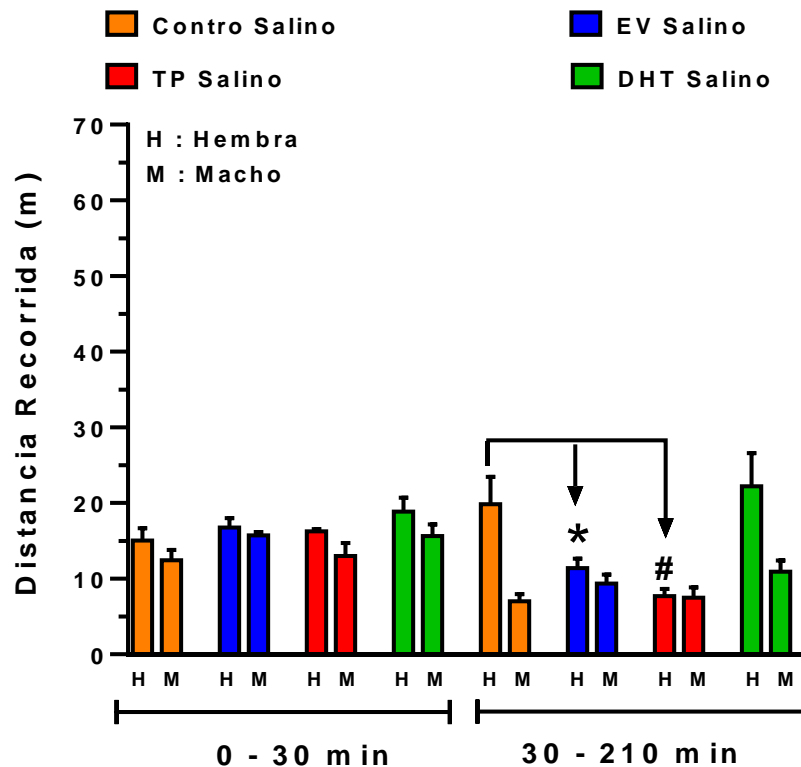
Respecto a la actividad locomotora acumulativa medida entre los 30 a 210 minutos e inducida por Salino (1 ml/kg s.c.) se observó que las ratas hembras EV ($11,39 \pm 1,23$ m) ($[F_{(3,17)}=6,767; P=0,0233]$) y ratas hembras TP ($7,68 \pm 0,94$ m) ($[F_{(3,17)}=6,767; P=0,0041]$) que recibieron la inyección del salino tuvieron una disminución significativa en la locomoción respecto a ratas hembras control ($19,83 \pm 3,60$ m).

Machos: Al analizar la actividad locomotora acumulativa basal durante los primeros 30 minutos del protocolo experimental (Gráfico 10), se observó que no hubo cambios estadísticamente significativos en la locomoción basal entre las ratas machos control ($12,44 \pm 1,34$ m), EV ($15,73 \pm 0,43$ m), TP ($12,99 \pm 1,71$ m) y DHT ($15,63 \pm 1,54$ m) que iban a recibir la inyección de salino.

Respecto a la actividad locomotora acumulativa medida entre los 30 a 210 minutos e inducida por salino (1 ml/kg s.c.) se observó que no hubo cambios estadísticamente significativos en la locomoción basal entre las ratas machos control ($7,00 \pm 0,94$ m), EV ($9,33 \pm 1,20$ m), TP ($7,47 \pm 1,37$ m) y DHT ($10,92 \pm 1,46$ m) que recibieron la inyección de Salino. (Gráfico 10)

Gráfico 10

Actividad Locomotora Acumulativa



La Actividad Locomotora de Curso Temporal Basal (0-30 min) y Estimulada (30-210 min) por salino (1 ml/kg s.c.) en hembras y machos, medidas a través del Software ANY-MAZE™ entre el DPN 60-62. Ratas hembras control salino n=5, hembras EV salino n=6, hembras TP salino n=6, hembras DHT salino n=6, machos control salino n=7, machos EV salino n=5, machos TP salino n=5, machos DHT salino n=5. Se expresó el promedio +/- EEM. El análisis estadístico se realizó utilizando un ANOVA de una vía post-test LSD-Fisher. (*<0,05; #<0,01).

DISCUSIÓN

1) Efectos de la Administración Neonatal de Hormonas Sexuales sobre Tejidos

Sensibles:

1.1) Efectos en Órganos Sensibles a la Acción de EV, TP y DHT en Hembras:

En las hembras expuestas a EV y TP el DPN-1 se observó una disminución significativa del tamaño del ovario izquierdo y útero respecto a las ratas control (Gráfico 2, Panel B y C). Está descrito en la literatura una reducción del tamaño del ovario que se produce por un aumento de quistes ováricos y una ausencia de cuerpos lúteos (CL) en ratas hembras expuestas el DPN-1 a EV y TP [42, 45]. Esta disminución en el número de CL se ha relacionado con una disminución significativa de los niveles séricos de progesterona [42, 45]. Por otro lado, la aciclicidad estral de las ratas EV está relacionada directamente con la condición anovulatoria observada en estudios anteriores [45], evidenciada como disminución de CL. En nuestra tesis, esta condición de aciclicidad estral es un excelente control respecto a la administración de EV, ya que experiencias previas de nuestro laboratorio que han sido asociadas a un mal procedimiento en la inyección de EV o en la administración de una dosis insuficiente de EV, se asocian claramente a una ciclicidad normal. Incluso, hemos confirmado los eventos anteriores con el tamaño de las gónadas, observando que los ovarios presentan reducción de tamaño producida cuando se administra correctamente el EV. En el caso de ratas hembras androgenizadas (TP y DHT) se observó una agénesis vaginal que impidió medir la etapa del ciclo estral. Esta condición también ha sido descrita previamente [38, 45] y para no forzar la obtención del frotis que llevaría a un estrés mayor en los animales, se decidió no realizar la medición

del ciclo estral. También en el caso de ratas hembras TP se observó una disminución del tamaño del ovario, mientras que en ratas hembras DHT no sucedió. Posiblemente, el efecto de TP sobre el tamaño de los órganos sexuales esté mediado en parte por la conversión de T a E_2 mediada por la aromatasa [46]. Cabe señalar, que esta enzima se expresa en tejidos reproductivos como el ovario y no reproductivos, como el tejido adiposo, el hígado y el cerebro [46-48]. A nivel del tamaño de la hipófisis se encontró que ratas hembras EV y TP tienen una disminución significativa de su tamaño respecto ratas hembras control, sin observarse cambios en las ratas DHT. La evidencia en la literatura demuestra que las hipófisis de ovejas recién nacidas tienen a nivel de células gonadótropas una proporción alta de ERs [50], y si asumimos una expresión similar de estos receptores en la hipófisis de rata, se podría esperar que la sensibilidad de esta glándula a estrógenos durante las primeras horas de vida pueda generar una atrofia hipofisaria.

1.2) Efectos en Órganos Sensibles a la Acción de EV, TP y DHT en Machos

Al igual que las hembras la determinación del tamaño de tejidos sensibles a la acción de hormonas sexuales en machos es un excelente control experimental de la administración de las hormonas sexuales. Por ejemplo, en los machos expuestos a EV y TP se encontró una disminución significativa del tamaño del testículo izquierdo y vesícula seminal respecto a las ratas control (Gráfico 3, Panel 2 y 3). Estos efectos podrían deberse a una disminución de los niveles plasmáticos de T que hemos observado previamente (material suplementario [41]) y que han sido asociados a una mayor aromatización a E_2 [50].

En los machos y al igual que las hembras, la exposición neonatal a EV y TP se asoció a una disminución significativa del tamaño de la hipófisis respecto ratas controles (Gráfico 3, Panel A), sin observarse cambios en las ratas DHT. Posiblemente E_2 y T proveniente de EV y TP ejerzan una retroalimentación negativa sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónada durante el desarrollo neonatal que favorezca la hipoplasia hipofisiaria.

2) Efectos de la Reprogramación Neonatal con Hormonas Sexuales sobre Actividad Locomotora Inducida por Morfina en Ratas Adultas.

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que la actividad locomotora inducida por morfina aumenta en ratas hembras y machos control, EV, TP, y DHT con respecto al control (Gráficos 5, 6, 7 y 8). En la literatura se ha descrito un aumento de la actividad locomotora en ratas machos y hembras inducidas por morfina usando una dosis de 3.2 mg/kg s.c. y un protocolo similar al nuestro [51]. Una posible explicación para este efecto farmacológico de la morfina se puede asociar a su acción agonista sobre los receptores μ opioides expresados en interneuronas GABAérgicas del VTA, que llevan a la hiperpolarización de estas neuronas e indirectamente a la activación de neuronas dopaminérgicas involucrados en la locomoción y recompensa [14,15]. Respecto, a la reprogramación neonatal con las hormonas sexuales se observó que las ratas hembras DHT tuvieron una mayor actividad locomotora inducida por morfina que ratas hembras Control, EV y TP. Este resultado nos podría sugerir que la exposición neonatal a DHT podría estar modulando positivamente la expresión de receptores μ opioides en las zonas cerebrales relacionadas con la recompensa. Sin embargo, para poder corroborar esta hipótesis se debería realizar pruebas para determinar la expresión del receptor μ

opioides, como q-PCR e inmunoblots. Por otra parte, en esta tesis no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad locomotora inducida por morfina en las ratas hembras EV y TP, respecto ratas hembras control (Gráfico 9), sugiriéndonos que la administración neonatal de estas hormonas no afectaría la expresión de los receptores μ opioides en ratas hembras. En este sentido, en la literatura se ha demostrado que el tratamiento con 17 β -estradiol-3-benzoato no afecta los niveles de mRNA del receptor μ -opioide en áreas cerebrales, como la amígdala, el hipocampo, el putamen-caudado y la habénula medial de ratas hembras OVX [33]. Sin embargo, los niveles de expresión del receptor μ -opioide en VTA usando nuestro protocolo experimental no ha sido evaluado.

En machos se observó un incremento de la actividad locomotora inducida por morfina en ratas EV, TP y DHT, respecto ratas machos control. Este resultado es muy interesante, ya que sugiere que la reprogramación por hormonas sexuales modularía positivamente la actividad locomotora inducida por agonistas del receptor μ -opioide. Antecedentes en la literatura muestran que utilizando inmunohistoquímica se determinó la presencia del receptor μ opioide y receptor de andrógenos (AR) en neuronas del ganglio del trigémino (GT) [52]. Además, en ese trabajo se demostró que el AR funciona como un regulador transcripcional de la actividad del gen del receptor μ opioide en la misma zona cerebral [52]. Interesantemente también se demostró que la flutamida, un antagonista selectivo del AR, impide la transcripción del mRNA del receptor μ opioide en GT y bloquea el efecto de DAMGO (un agonista selectivo del receptor μ opioide) [52].

Por otra parte, existe amplia evidencia en la literatura sobre el área cerebral llamada tegumento rostromedial (tVTA/RMTg) en cuanto a la alta densidad de neuronas GABAérgicas que proyectan sus axones a las neuronas dopaminérgicas de SN-VTA [53]. Se ha demostrado que la inyección de agonistas μ opiodes dentro del tVTA/RMTg reduce el dolor a una inyección subcutánea de formalina, y que infusiones de agonistas μ opiodes dentro del tVTA/RMTg favorecen las conductas de autoadministración y de preferencia de Lugar condicionado a la droga [54]. Funcionalmente la presencia de receptores μ opiodes en el VTA ha sido caracterizado usando agonistas de estos receptores y registrando células vecinas. Así por ejemplo la Dr. Katia Gysling demostró en 1983 que la administración de morfina por iontoforesis en el VTA producía la inhibición de un grupo de neuronas en este núcleo y la activación de otras [14]. Sin embargo, no fue hasta la década de los 90 que se demostró que las neuronas que se inhibían por la acción de la morfina en el VTA eran neuronas GABAérgicas [15]. Recientemente, a nivel electrofisiológico se demostró que específicamente la morfina induce la activación de las neuronas dopaminérgicas del VTA mediada por la activación del receptor μ opioide en las neuronas GABAérgicas del tVTA/RMTg [55]. Sin duda, la evidencia neuroanatómica y funcional que asocian a los receptores μ opioides con conductas de recompensa y los efectos neuromoduladores que tendrían las hormonas sexuales sobre estos receptores aún permanece por ser explorado.

En esta tesis se observaron diferencias sexuales en la actividad locomotora inducida por morfina en ratas hembras, respecto a ratas machos. En la literatura existe evidencia de que ratas hembras tratadas con 1, 3.2 y 10 mg/kg s.c. de morfina tienen una mayor

actividad locomotora que ratas machos [51]. En este mismo estudio se demostró que las ratas hembras en etapa de proestro que recibieron 10 mg/kg s.c. de morfina fueron más hiperactivas que ratas en etapa de diestro [51]. Esto podría sugerirnos fuertemente que el E₂ juega un importante rol en conductas inducidas por drogas de abuso, específicamente por agonistas de receptores μ opioides, en ratas hembras. Con respecto a los machos se ha demostrado que ratas machos gonadectomizadas (GDX) no presentan cambios significativos en locomoción inducida por morfina que ratas machos GDX con reemplazo de T [51], sugiriendo que la T no tendría un rol relevante en la locomoción inducida por morfina en ratas machos.

En otras pruebas farmacológicas usando agonistas μ opioides no se han observado diferencias sexuales. Por ejemplo, en experimentos donde evalúan la ausencia o presencia de dolor (protocolo de plato caliente y la prueba de retirada de cola) en ratas machos GDX, hembras GDX, machos GDX con reemplazo hormonal de T y hembras GDX con reemplazo hormonal de E₂ y Progesterona, y usando la administración s.c. de varios analgésicos opioides (hidromorfona, buprenorfina) no se observaron diferencias significativas en la tasa de analgesia entre los grupos experimentales [56].

CONCLUSIONES

- 1) La morfina aumenta la actividad locomotora en ratas hembras y machos de los grupos experimentales control, EV, TP y DHT, respecto a la administración de solución salina fisiológica.
- 2) Las ratas hembras DHT presentaron un aumento en la actividad locomotora inducida por morfina, respecto a la administración de morfina en ratas hembras de los grupos control, EV y TP.
- 3) Las ratas machos tratadas con EV, TP y DHT presentaron un aumento en la actividad locomotora inducida por morfina, respecto a la administración de morfina en ratas machos control.
- 4) La morfina aumenta la actividad locomotora en ratas hembras de los grupos experimentales control, EV y DHT, respecto a los machos de los mismos grupos experimentales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wise, R.A., *Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives*. *Neuron*, 2002. **36**(2): p. 229-40.
2. Morikawa, H. and C.A. Paladini, *Dynamic regulation of midbrain dopamine neuron activity: intrinsic, synaptic, and plasticity mechanisms*. *Neuroscience*, 2011. **198**: p. 95-111.
3. Koob, G.F. and N.D. Volkow, *Neurocircuitry of addiction*. *Neuropsychopharmacology*, 2010. **35**(1): p. 217-38.
4. Pfaus, J.G., et al., *Sexual behavior enhances central dopamine transmission in the male rat*. *Brain Res*, 1990. **530**(2): p. 345-8.
5. Bassareo, V. and G. Di Chiara, *Differential influence of associative and nonassociative learning mechanisms on the responsiveness of prefrontal and accumbal dopamine transmission to food stimuli in rats fed ad libitum*. *J Neurosci*, 1997. **17**(2): p. 851-61.
6. Kalivas, P.W. and N.D. Volkow, *The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice*. *Am J Psychiatry*, 2005. **162**(8): p. 1403-13.
7. Di Chiara, G. and A. Imperato, *Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(14): p. 5274-8.
8. Fields, H.L. and E.B. Margolis, *Understanding opioid reward*. *Trends Neurosci*, 2015. **38**(4): p. 217-25.
9. Le Merrer, J., et al., *Reward processing by the opioid system in the brain*. *Physiol Rev*, 2009. **89**(4): p. 1379-412.
10. Chen, Y., et al., *Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain*. *Mol Pharmacol*, 1993. **44**(1): p. 8-12.
11. Williams, J.T., et al., *Regulation of μ -Opioid Receptors: Desensitization, Phosphorylation, Internalization, and Tolerance*. *Pharmacol Rev*, 2013. **65**(1): p. 223-54.
12. Pasternak, G.W. and Y.X. Pan, *Mu Opioids and Their Receptors: Evolution of a Concept*. *Pharmacol Rev*, 2013. **65**(4): p. 1257-317.
13. Suzuki, T., *[Treatment of Cancer Pain and Medical Narcotics]*. *Yakugaku Zasshi*, 2015. **135**(12): p. 1325-34.
14. Gysling, K. and R.Y. Wang, *Morphine-induced activation of A10 dopamine neurons in the rat*. *Brain Res*, 1983. **277**(1): p. 119-27.
15. Johnson, S.W. and R.A. North, *Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons*. *J Neurosci*, 1992. **12**(2): p. 483-8.
16. McEwen, B., *Estrogen actions throughout the brain*. *Recent Prog Horm Res*, 2002. **57**: p. 357-84.
17. Belcher, S.M. and A. Zsarnovszky, *Estrogenic actions in the brain: estrogen, phytoestrogens, and rapid intracellular signaling mechanisms*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001. **299**(2): p. 408-14.
18. Ganong, W.F., *Fisiología Médica*. Vigésima Edición ed. 2006, México, D.F.: Editorial El Manual Moderno, México.
19. Guyton, A.C. and J.E. Hall, *Tratado de fisiología médica*. 2014/04/23 ed. 2011, Barcelona, España: Elsevier España, S.L.
20. Alexander, S.P., et al., *The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: Nuclear hormone receptors*. *Br J Pharmacol*, 2015. **172**(24): p. 5956-78.
21. Becker, J.B., *Sexual differentiation of motivation: a novel mechanism?* *Horm Behav*, 2009. **55**(5): p. 646-54.
22. Becker, J.B. and M. Hu, *Sex differences in drug abuse*. *Front Neuroendocrinol*, 2008. **29**(1): p. 36-47.
23. Ravizza, T., J. Veliskova, and S.L. Moshe, *Testosterone regulates androgen and estrogen receptor immunoreactivity in rat substantia nigra pars reticulata*. *Neurosci Lett*, 2003. **338**(1): p. 57-61.

24. Kritzer, M.F., *Selective colocalization of immunoreactivity for intracellular gonadal hormone receptors and tyrosine hydroxylase in the ventral tegmental area, substantia nigra, and retrorubral fields in the rat.* J Comp Neurol, 1997. **379**(2): p. 247-60.
25. Jones, M.E., et al., *Of mice and men: the evolving phenotype of aromatase deficiency.* Trends Endocrinol Metab, 2006. **17**(2): p. 55-64.
26. Celotti, F., R.C. Melcangi, and L. Martini, *The 5 alpha-reductase in the brain: molecular aspects and relation to brain function.* Front Neuroendocrinol, 1992. **13**(2): p. 163-215.
27. Johnson, M.L., et al., *Oestrogen receptors enhance dopamine neurone survival in rat midbrain.* J Neuroendocrinol, 2010. **22**(4): p. 226-37.
28. Yanagihara, N., et al., *Stimulation of catecholamine synthesis through unique estrogen receptors in the bovine adrenomedullary plasma membrane by 17beta-estradiol.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **339**(2): p. 548-53.
29. Yanagihara, N., et al., *Stimulation of catecholamine synthesis by environmental estrogenic pollutants.* Endocrinology, 2005. **146**(1): p. 265-72.
30. Chavez, C., et al., *The effect of estrogen on dopamine and serotonin receptor and transporter levels in the brain: an autoradiography study.* Brain Res, 2010. **1321**: p. 51-9.
31. Johnson, M.L., et al., *Androgen decreases dopamine neurone survival in rat midbrain.* J Neuroendocrinol, 2010. **22**(4): p. 238-47.
32. Teodorov, E., et al., *Treatment with steroid hormones and morphine alters general activity, sexual behavior, and opioid gene expression in female rats.* Life Sci, 2014. **104**(1-2): p. 47-54.
33. Quinones-Jenab, V., et al., *Estrogen regulation of mu-opioid receptor mRNA in the forebrain of female rats.* Brain Res Mol Brain Res, 1997. **47**(1-2): p. 134-8.
34. Torres-Reveron, A., et al., *Ovarian steroids alter mu opioid receptor trafficking in hippocampal parvalbumin GABAergic interneurons.* Exp Neurol, 2009. **219**(1): p. 319-27.
35. Pluchino, N., et al., *Sex differences in brain and plasma beta-endorphin content following testosterone, dihydrotestosterone and estradiol administration to gonadectomized rats.* Neuroendocrinology, 2009. **89**(4): p. 411-23.
36. Limonta, P., et al., *Testosterone and postnatal ontogenesis of hypothalamic mu ([3H]dihydromorphine) opioid receptors in the rat.* Brain Res Dev Brain Res, 1991. **62**(1): p. 131-6.
37. Lucas, A., *Programming by early nutrition in man.* Ciba Found Symp, 1991. **156**: p. 38-50; discussion 50-5.
38. Sotomayor-Zarate, R., et al., *Neonatal exposure to single doses of estradiol or testosterone programs ovarian follicular development-modified hypothalamic neurotransmitters and causes polycystic ovary during adulthood in the rat.* Fertil Steril, 2011. **96**(6): p. 1490-6.
39. Sundblad, C. and E. Eriksson, *Reduced extracellular levels of serotonin in the amygdala of androgenized female rats.* Eur Neuropsychopharmacol, 1997. **7**(4): p. 253-9.
40. Dominguez, R., et al., *Effect of steroid injection to newborn rats on serotonin activity in frontal cortex and raphe.* Neuroreport, 2003. **14**(4): p. 597-9.
41. Espinosa, P., et al., *Programming of Dopaminergic Neurons by Neonatal Sex Hormone Exposure: Effects on Dopamine Content and Tyrosine Hydroxylase Expression in Adult Male Rats.* Neural Plast, 2016. **2016**: p. 4569785.
42. Cruz, G., et al., *Neonatal exposure to estradiol valerate increases dopamine content in nigrostriatal pathway during adulthood in the rat.* Horm Metab Res, 2014. **46**(5): p. 322-7.
43. Centola, G.M., *Surface features of exfoliated vaginal epithelial cells during the oestrous cycle of the rat examined by scanning electron microscopy.* J Anat, 1978. **127**(Pt 3): p. 553-61.
44. Barraclough, C.A., *Production of anovulatory, sterile rats by single injections of testosterone propionate.* Endocrinology, 1961. **68**: p. 62-7.
45. Sotomayor-Zarate, R., et al., *Neonatal exposure to estradiol valerate programs ovarian sympathetic innervation and follicular development in the adult rat.* Biol Reprod, 2008. **78**(4): p. 673-80.
46. Picon, R., et al., *Conversion of androgen to estrogen by the rat fetal and neonatal female gonad: effects of dcAMP and FSH.* J Steroid Biochem, 1985. **23**(6A): p. 995-1000.

47. Raab, H., et al., *Ontogeny of aromatase messenger ribonucleic acid and aromatase activity in the rat midbrain*. Brain Res Mol Brain Res, 1995. **34**(2): p. 333-6.
48. Lephart, E.D., *Molecular aspects of brain aromatase cytochrome P450*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1997. **61**(3-6): p. 375-80.
49. Yuan, X., et al., *Expression of androgen receptor and its co-localization with estrogen receptor-alpha in the developing pituitary gland of sheep fetus*. Histochem Cell Biol, 2007. **127**(4): p. 423-32.
50. Persky, R.W., et al., *Neonatal testosterone exposure protects adult male rats from stroke*. Neuroendocrinology, 2013. **97**(3): p. 271-82.
51. Craft, R.M., et al., *Sex differences in locomotor effects of morphine in the rat*. Pharmacol Biochem Behav, 2006. **85**(4): p. 850-8.
52. Lee, K.S., et al., *Androgen receptor transcriptionally regulates mu-opioid receptor expression in rat trigeminal ganglia*. Neuroscience, 2016. **331**: p. 52-61.
53. Jhou, T.C., et al., *The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: A structure targeted by the lateral habenula that projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta*. J Comp Neurol, 2009. **513**(6): p. 566-96.
54. Jhou, T.C., et al., *Mapping of reinforcing and analgesic effects of the mu opioid agonist endomorphin-1 in the ventral midbrain of the rat*. Psychopharmacology (Berl), 2012. **224**(2): p. 303-12.
55. Jalabert, M., et al., *Neuronal circuits underlying acute morphine action on dopamine neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(39): p. 16446-50.
56. Stoffel, E.C., et al., *Gonadal hormone modulation of mu, kappa, and delta opioid antinociception in male and female rats*. J Pain, 2005. **6**(4): p. 261-74.