



FACULTAD DE CIENCIAS

LABORATORIO DE NEUROQUÍMICA Y NEUROFARMACOLOGÍA

CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA Y PLASTICIDAD CEREBRAL

INSTITUTO DE FISILOGÍA

**LA ADMINISTRACIÓN NEONATAL DE ESTRADIOL VALERATO AFECTA LA
NEUROTRANSMISIÓN DOPAMINÉRGICA DE LA RATA ADULTA. IMPLICANCIAS EN EL
DESARROLLO DE LA CONDUCTA ADICTIVA**

Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico

RAÚL CRISTOBAL RIQUELME NECULPAN

Director de Tesis: **Dr. Ramón Sotomayor-Zárate**

2014

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de este trabajo fue posible gracias al financiamiento del proyecto FONDECYT N°111-21205 de Iniciación en Investigación del Dr. Ramón Sotomayor-Zárate y al financiamiento de la Iniciativa Científica Milenio Núcleo Milenio Estrés y Adicción, proyecto N° P10/063-F.

Parte de los resultados de esta tesis han sido publicados recientemente en la revista *"Hormone and Metabolic Research"* 2014; 46(05): 322-327 y presentados en el XXXV Congreso de la Sociedad de Farmacología de Chile y en el 17º Congreso Mundial de Farmacología en Ciudad del Cabo, Sudáfrica.

INDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	10
Concepto de Reprogramación por Hormonas Sexuales:	10
Circuito de la Recompensa Cerebral:.....	10
Hormonas Sexuales y Circuito Mesocorticolímbico:.....	11
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	15
Objetivo General:.....	15
Objetivos Específicos:	15
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Animales:.....	17
Procedimiento Experimental: Administración de EV.....	17
Reactivos:.....	18
Registro de la Etapa del Ciclo Estral:.....	19
Determinación de los Niveles Séricos de Estradiol y Progesterona:	19
Homogenización de Tejidos Cerebrales:.....	20
Microdiálisis Cerebral <i>in vivo</i> :	20
Determinación de DA por Cromatografía Líquida de Alta Resolución Acoplada a Detección Electroquímica:	24
Actividad Locomotora:.....	26
Cálculos y Análisis Estadístico:	26

RESULTADOS	28
Evaluación de los Niveles Séricos de las Hormonas Sexuales y del Tamaño de los Órganos Reproductivos Sensibles a los Estrógenos: Una Medida de la Eficacia de la Administración Neonatal de EV.....	28
Evaluación del Índice Androgénico, como un Parámetro de Medición de un Posible Efecto Anabólico Producido por la Administración Neonatal de EV y del Peso de la Hipófisis, como Medida de Eficacia de la Estrogenización en Tejido no Reproductivo.	29
Evaluación de las Curvas de Ganancia de Peso de Ratas Hembras y Machos Control y Tratadas Durante las Primeras Horas de Vida con EV.	31
Efectos sobre la Funcionalidad Reproductiva de Ratas Adultas Control y Tratadas con EV al PND1: Ciclicidad Estral y Apertura Vaginal.	32
Contenido de Neurotransmisores Catecolaminérgicos en SN-VTA y Cuerpo Estriado al PND60-62 de Ratas Hembras Control y Tratadas con EV al PND1: Estudios Neuroquímicos <i>in vitro</i>	33
Contenido de Metabolitos de DA en SN-VTA y CE al PND60-62 de Ratas Hembras Control y Tratadas con EV al PND1: Estudios Neuroquímicos <i>in vitro</i>	35
Contenido de DA en SN-VTA y Cuerpo Estriado al PND60-62 de Ratas Machos Control y Tratadas con EV al PND1: Estudios Neuroquímicos <i>in vitro</i>	37
Actividad Locomotora Basal e Inducida por la Administración Sistémica de Anfetamina en Ratas Hembras Control y Tratadas con EV al PND1: Estudios Conductuales.	38
Actividad Locomotora Basal e Inducida por la Administración Sistémica de Anfetamina en Ratas Machos Control y Tratadas con EV al PND1: Estudios Conductuales.	39
Liberación de DA en NAcc Inducida por K ⁺ [70 mM] al PND60-62 de Ratas Control y Tratadas con EV al PND1: Estudios Neuroquímicos <i>in vivo</i>	40
Liberación de DA en NAcc Inducida por Anfetamina Intra-NAcc al PND60-62 de Ratas Control y Tratadas con EV al PND1: Estudios Neuroquímicos <i>in vivo</i>	42
Liberación de DA en NAcc Inducida por Anfetamina Sistémica al PND60-62 de Ratas Hembras y Machos Control y Tratadas con EV al PND1: Estudios Neuroquímicos <i>in vivo</i>	43
DISCUSIÓN	45
Caracterización del Modelo de Administración Neonatal de EV:.....	45

Contenido de DA y Metabolitos en las Vías Nigroestriatal y Mesolímbica de Ratas Adultas Expuestas a la Administración Neonatal a EV:.....	48
Actividad Locomotora Basal e Inducida por Anfetamina en Ratas Adultas Expuestas a la Administración Neonatal a EV:	50
Liberación de DA en NAcc Inducida por Potasio en Ratas Adultas Expuestas a la Administración Neonatal a EV:.....	52
Liberación de DA en NAcc Inducida por Anfetamina en Ratas Adultas Expuestas a la Administración Neonatal a EV:	53
CONCLUSIONES	55
BIBLIOGRAFÍA	57

RESUMEN

La investigación en reprogramación se ha centrado en el estudio de estímulos que afectan períodos sensibles del desarrollo, como la etapa prenatal y neonatal. Se ha demostrado que la exposición neonatal a estradiol valerato en ratas hembras aumenta el contenido de catecolaminas en el área tuberoinfundibular de la rata adulta. Sin embargo, los efectos de este modelo en otros circuitos dopaminérgicos no han sido estudiados. El propósito de este trabajo fue determinar los efectos de la administración neonatal de estradiol valerato, sobre el contenido de neurotransmisores catecolaminérgicos en la vía nigroestriatal y en la liberación de dopamina en Núcleo Accumbens de ratas adultas. Los resultados anteriores fueron comparados con un grupo paralelo control al cual se le administró aceite de maíz.

Se determinó que la administración neonatal de estradiol valerato produce un aumento significativo en el contenido de dopamina en la vía nigroestriatal y en el Área Tegmental Ventral, de ratas hembras adultas. En machos se observó un aumento significativo en el contenido de dopamina en la Sustancia Nigra-Área Tegmental Ventral. Respecto a la liberación de dopamina en Núcleo Accumbens observamos un aumento significativo de la liberación de dopamina frente a un estímulo depolarizante en ratas hembras estrogenizadas. Sin embargo, se observó una reducción en la liberación de dopamina inducida por amfetamina en ratas hembras expuestas a estradiol valerato. Funcionalmente, esta disminución en la liberación de dopamina inducida por amfetamina se relacionó con una menor actividad locomotora. Los resultados de esta tesis nos

demuestran que la exposición neonatal a compuestos estrogénicos producen efectos a largo plazo no sólo a nivel reproductivo, sino también a nivel de circuitos dopaminérgicos relacionados con motivación y locomoción.

ABSTRACT

Reprogramming research has focused on the study of stimuli that affect sensitive periods of development, such as prenatal and neonatal stage. It has been shown that neonatal exposure to estradiol valerate in female rats increased catecholamine content in the tuberoinfundibular area of the adult rat. However, the effects of this model in other dopaminergic circuits have not been studied. The purpose of this study was to determine the effects of neonatal administration of estradiol valerate on the content of catecholamine neurotransmitters in the nigrostriatal pathway and the dopamine release in Nucleus Accumbens of adult rats. The above results were compared with a control group that received corn oil.

It was determined that the neonatal administration of estradiol valerate produces a significant increase in dopamine content in the nigrostriatal pathway and in the ventral tegmental area of adult female rats. In adult males rats a significant increase was observed in the dopamine content of substantia nigra-ventral tegmental area. Regarding the dopamine release in Nucleus Accumbens, we observed a significant increase in dopamine release induced by depolarizing stimulus in estrogenized female rats. However, there was a reduction in dopamine release induced by amphetamine in female rats exposed to estradiol valerate.. Functionally, this decrease in dopamine release induced by amphetamine was associated with reduced locomotor activity. The results of this thesis demonstrate that neonatal exposure to estrogenic compounds produces long-term effects

not only at reproductive level, but also at the level of brain dopaminergic circuits related to motivation and locomotion.

INTRODUCCIÓN

Concepto de Reprogramación por Hormonas Sexuales:

La reprogramación es definida como la redirección fisiológica de un tejido u órgano por efecto de un estímulo o daño en un período sensible del desarrollo fetal y postnatal temprano, que provoca cambios funcionales a largo plazo [1]. 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.

A nivel del sistema reproductivo, se ha observado que la exposición neonatal a compuestos con actividad estrogénica produce alteraciones en el funcionamiento de las gónadas, afectando la fertilidad en humanos y animales [2]. En este sentido, se ha demostrado que la administración neonatal de disruptores endocrinos [3,4] u hormonas sexuales [5,6] producen atrofia de las gónadas, aciclicidad estral y adelantamiento de la pubertad. Cabe señalar que los efectos de estos compuestos con actividad estrogénica no sólo son observados en tejidos reproductivos, sino también en otros órganos como el cerebro.

Circuito de la Recompensa Cerebral:

El Circuito de la Recompensa Cerebral es un circuito neuroanatómico presente en cerebro de animales y que se activan por las sensaciones placenteras, como el sexo, la comida y la ingesta de líquidos, entre otros [7,8]. Estos estímulos producen placer a través de la

liberación de un neurotransmisor catecolaminérgico llamado dopamina (DA). La DA es un neurotransmisor sintetizado en neuronas localizadas 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) [para revisión ver 9]. Estas neuronas dopaminérgicas sintetizan DA a través de diversas reacciones enzimáticas, cuya enzima limitante de síntesis es la Tirosina Hidroxilasa (TH). La DA sintetizada en neuronas dopaminérgicas del VTA es liberada de proyecciones neuronales eferentes que llegan al Núcleo Accumbens (NAcc) y a la Corteza Prefrontal (CPF) [9-11]. Las conexiones neurales entre estos núcleos forman el conocido Circuito de la Recompensa Cerebral o Circuito Mesocorticolímbico [10]. El Circuito Mesocorticolímbico regula el placer por recompensantes naturales, como sexo [7] y comidas [12] 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 [9,11]. En este contexto, se ha demostrado a través del uso de la técnica de microdiálisis cerebral *in vivo*, que prácticamente todas las drogas de abuso utilizadas por humanos producen un aumento en la liberación de DA en el Circuito Mesocorticolímbico de la rata [8].

Hormonas Sexuales y Circuito Mesocorticolímbico:

Las hormonas sexuales presentan características fisicoquímicas que las hacen ser muy lipofílicas, por este motivo son capaces de cruzar membranas biológicas y ejercer sus efectos a través de receptores citoplasmáticos. Por otro lado, esta característica permite que hormonas sexuales, como estrógenos puedan cruzar la barrera hematoencefálica y

tener efectos a nivel del sistema nervioso central [13,14]. Los receptores de estrógenos (ER) citoplasmáticos identificados actualmente son dos y se les denomina con las letras griegas α y β (ER α y ER β). El ER α y ER β pertenecen a la clasificación de receptores nucleares y específicamente son miembros de la superfamilia de receptores de factores de transcripción Esteroides/Tiroides. A nivel del sistema nervioso central, los ER se localizan en diversas áreas cerebrales [13], incluyendo el Circuito Mesocorticolímbico [15,16]. En este sentido, se ha demostrado que en roedores ovariectomizados (OVX) se produce una disminución de neuronas TH positivas en SN y VTA [17]. De acuerdo a esto, el reemplazo con agentes estrogénicos, como estradiol (E2: agonista no selectivo de ER α y ER β), diarilpropionitrilo (DPN: agonista selectivo de ER β) y propil-pirazol-triol (PPT: agonista selectivo de ER α) en roedores OVX, ha demostrado restablecer los niveles normales la expresión de TH en SN y VTA [17]. A nivel conductual se ha demostrado que la administración de psicoestimulantes como anfetamina, a ratas OVX no produce preferencia de lugar condicionado (CPP) [18], un paradigma conductual ampliamente utilizado en los estudios neurobiológicos de adicción. Este CPP es producido por la administración de psicoestimulantes [19]. Sin embargo, cuando se realiza el reemplazo hormonal con estradiol o DPN en estas ratas OVX, se reestablece la preferencia de lugar condicionada a la anfetamina [18]. En este mismo sentido y utilizando otro paradigma conductual, se ha observado que la administración de Estradiol Benzoato (EB) incrementa la actividad locomotora y sensibilización conductual inducida por cocaína en ratas OVX [20].

Como observamos los estrógenos son capaces de modular la actividad de neuronas dopaminérgicas, posiblemente a través de modificar los patrones de expresión de varias proteínas involucradas en la sinapsis dopaminérgica. Así por ejemplo, se ha demostrado que en ratas OVX se produce una disminución de neuronas TH positivas en SN-VTA [17] y de la proteína transportadora de DA (DAT) en NAcc [21]. Por otro lado, se ha demostrado que disruptores endocrinos con actividad estrogénica, como p-nonilfenol y bisfenol-A (BPA) aumentan la actividad de la TH, produciendo una mayor síntesis de catecolaminas en células de la médula adrenal bovina [22,23].

La evidencia antes descrita ha demostrado que compuestos estrogénicos son capaces de modular proteínas relacionadas con la actividad dopaminérgica en animales adultos, sin embargo los efectos que estos compuestos puedan producir en cerebros inmaduros han sido menos estudiados. Recientemente, se demostró que la administración neonatal de Estradiol Valerato (EV) produce un incremento de neurotransmisores monoaminérgicos, como DA, noradrenalina (NA) y serotonina (5-HT) en áreas hipotálamicas tuberales, como Hipotálamo Ventromedial y Núcleo Arcuato [6]. Sin embargo, estudios con este modelo experimental no han sido conducidos para evaluar los efectos a largo plazo en otras áreas monoaminérgicas, como SN-VTA, Cuerpo Estriado (CE) y NAcc.

El desarrollo de esta tesis se baso en el estudio de los efectos neuroquímicos a largo plazo de la administración neonatal de EV sobre núcleos cerebrales dopaminérgicos de los Circuitos Nigroestriatal y Mesocorticolímbico.

HIPÓTESIS

“La administración de EV en ratas hembras y machos neonatas produce un aumento del contenido de DA en SN-VTA y CE, una mayor liberación de DA en NAcc, y aumenta la actividad locomotora inducida por anfetamina, en ratas adultas”.

OBJETIVOS

Objetivo General:

“Estudiar los efectos de la administración neonatal de EV en ratas hembras y machos sobre el contenido de DA en SN-VTA y CE, la liberación de DA en NAcc, y la actividad locomotora inducida por anfetamina en la vida adulta de las ratas”.

Objetivos Específicos:

Para dar cumplimiento al objetivo general de esta tesis se propuso desarrollar los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar los efectos de la administración neonatal de EV (0,1 mg/50 μ L s.c. por rata) y aceite de maíz (50 μ L s.c.) en ratas hembras y machos de la cepa Sprague-Dawley al día postnatal 1 (PND1), sobre el contenido de DA en SN-VTA y CE al PND60, a través de cromatografía líquida de alta precisión acoplada a detección electroquímica.
- Estudiar los efectos de la administración neonatal de EV (0,1 mg/50 μ L s.c. por rata) y aceite de maíz (50 μ L s.c.) en ratas hembras y machos de la cepa Sprague-Dawley al día postnatal 1 (PND1), sobre la liberación de DA en NAcc al PND60, a través de microdiálisis cerebral *in vivo* y cromatografía líquida de alta precisión acoplada a detección electroquímica.
- Estudiar los efectos de la administración neonatal de EV (0,1 mg/50 μ L s.c. por rata) y aceite de maíz (50 μ L s.c.) en ratas hembras y machos de la cepa Sprague-Dawley al

día postnatal 1 (PND1), sobre la conducta de actividad locomotora basal e inducida por anfetamina (1 mg/Kg i.p.) al PND60, a través del análisis de video grabaciones utilizando el programa computacional ANY-Maze.

- Determinar los niveles plasmáticos de las hormonas sexuales estradiol y progesterona, en ratas hembras adultas (PND60) que fueron expuestas a la administración neonatal de EV (0,1 mg/50 μ L s.c. por rata) y aceite de maíz (50 μ L s.c.), a través de la técnica de enzimo inmunoensayo (EIA).
- Determinar parámetros morfométricos de peso de ovarios, útero e Hipófisis de ratas hembras adultas (PND60) que fueron expuestas a la administración neonatal de EV (0,1 mg/50 μ L s.c. por rata) y aceite de maíz (50 μ L s.c.). También se medirá en ratas hembras y machos el índice androgénico, medido como en cuociente entre el peso del músculo *tibialis* y el peso corporal de cada animal al PND60 de ratas que fueron expuestas a la administración neonatal de EV (0,1 mg/50 μ L s.c. por rata) y aceite de maíz (50 μ L s.c.). Además, durante el periodo de crecimiento se determinará la ciclicidad estral en ratas hembras y el control de peso de los animales expuestos a la administración neonatal de EV (0,1 mg/50 μ L s.c. por rata) y aceite de maíz (50 μ L s.c.).

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales:

Se utilizaron crías de rata Sprague Dawley recién nacidas. Todos los animales fueron alojados en una sala de mantención del Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso a una temperatura (22 ± 2 ° C) y humedad (50 %) controlada bajo ciclos luz-oscuridad (12:12 horas) encendiendo las luces a las 08:00 a.m. Los animales dispusieron de comida y agua *ad libitum*.

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética y de Bioseguridad de la Universidad de Valparaíso, otorgados al Proyecto Fondecyt 111-21205, cuyo Investigador Responsable es el Dr. Ramón Sotomayor-Zárate. Se hicieron todos los esfuerzos para reducir al mínimo el número de animales utilizados en este proyecto y su sufrimiento.

Procedimiento Experimental: Administración de EV.

Las crías se dividieron aleatoriamente en grupos de animales control y tratamiento (administración de aceite de maíz y EV, respectivamente). Cada animal del grupo EV se inyectó sólo durante las primeras 12 hr de vida con 0,1 mg de EV disueltos en 50 μ L de aceite de maíz. Grupos paralelos control fueron utilizados para cada grupo tratamiento. Los grupos control sólo recibieron durante las primeras 12 hr de vida 50 μ L de aceite de maíz. Cabe señalar que la dosis de EV utilizada fue publicada previamente [5,6,24,25]. Todas las crías fueron mantenidas con lactancia materna hasta la edad de destete

establecida al PND21. Tras el destete animales control y tratamiento (EV) se alojaron en jaulas de tamaño estándar (16 cm alto x 23 ancho cm x 44 largo cm) en grupos de 6 animales por caja. La longitud y frecuencia de los ciclos estrales se registraron a partir del PND40 hasta el final del estudio (PND60). El tiempo de apertura vaginal se registró en los grupos experimentales, como una medida de inicio de la pubertad. La ciclicidad estral se evaluó mediante el análisis de lavados vaginales diarios con un microscopio de luz, comparando la proporción relativa de los leucocitos, células epiteliales y células queratinizadas, las cuales cambian característicamente durante las diversas etapas del ciclo estral [26]. Entre los PND60-62 las ratas se sacrificaron por decapitación con guillotina en la etapa de diestro. Este rango de edad se utilizó para sincronizar la etapa diestro en ratas hembras controles con ratas hembras tratadas. Una vez eutanasiadas las ratas por decapitación con guillotina, se recolectó la sangre del tronco para determinar los niveles séricos de progesterona y estradiol. El ovario izquierdo, el útero y la glándula pituitaria se removieron y pesaron en una balanza analítica (Chyo, modelo JK-180). Al mismo tiempo, se extrajo el cerebro y se microdisectó SN-VTA y CE a 4°C, como se describe en trabajos previos [27,28]. Los tejidos cerebrales se pesaron y se almacenaron a -80°C para su posterior análisis de contenido de catecolaminas en SN-VTA y CE.

Reactivos:

El estándar de DA, NA, EDTA, ácido 1-octanosulfónico y EV fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, Missouri, EE.UU.). La anfetamina utilizada en esta tesis corresponde a la sal sulfato y fue donada por el Laboratorio Chile S.A. (Ñuñoa, Santiago, Chile) al

Núcleo Milenio Estrés y Adicción de la P. Universidad Católica de Chile. Todos los otros reactivos utilizados en esta tesis fueron de grado analítico.

Registro de la Etapa del Ciclo Estral:

El registro diario de la ciclicidad estral fue realizado a contar de PND40 y hasta el día PND 60-62 basados en las características citológicas que adopta el epitelio vaginal por efecto de los niveles circulantes de hormonas sexuales esteroidales y que es característica de las etapas periovulatorias [26]:

- Proestro: Etapa del ciclo estral de la rata de duración entre 12 a 24 horas y que citológicamente se caracteriza por presencia de células epiteliales nucleadas, bien redondeadas y solo algunas escamosas de forma irregular.
- Estro: Etapa del ciclo estral de la rata de duración entre 24 a 48 horas. Es el periodo de receptividad sexual por el macho. Citológicamente se caracteriza por presencia de células escamosas (con citoplasma granular), de forma irregular y agrupadas.
- Metaestro o Diestro 1: Duración de 12 a 24 horas. Presencia en el frotis de leucocitos y células escamosas.
- Diestro 2: Etapa del ciclo estral con una duración aproximada de 48 horas y con alta presencia en el frotis de leucocitos.

Determinación de los Niveles Séricos de Estradiol y Progesterona:

Los niveles séricos de estradiol y progesterona fueron determinados por EIA y siguiendo las instrucciones del fabricante. El número de catalogo de los kits de ensayos fueron 11-

ESTH-430 y 11-PROGH-305 para estradiol y progesterona, respectivamente (Alpco Diagnostic, Windham, NH).

Homogenización de Tejidos Cerebrales:

Los tejidos microdisectados (SN-VTA y CE) se homogenizaron según el protocolo utilizado previamente [5,19,29,30]. Brevemente, los tejidos fueron pesados y homogenizados en 400 μ L de ácido perclórico (PCA) 0,2 N. El homogenizado obtenido fue centrifugado a 13.000 g por 10 min a 4°C y el sobrenadante obtenido se separó y filtró a través de una unidad de filtración (0,2 μ m dispositivo de filtro, SM16534, Minisart NML, Sartorius) para ser usado en la determinación del contenido de NA y DA en SN-VTA y CE. El pellet residual de cada muestra fue resuspendido en una solución de NaOH 1N para la cuantificación de proteína a través del ensayo Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA, USA), usando albumina sérica bovina como estándar. El contenido de DA fue expresada como picogramos por miligramo de proteína total.

Microdiálisis Cerebral *in vivo*:

Las ratas Sprague-Dawley al PND60-62 (Hembras en etapa diestro) y pertenecientes a los grupos control y EV fueron anestesiadas con Hidrato de Cloral (HC: 400 mg/Kg, i.p.) e instaladas en un equipo estereotáxico (Modelo 68002, RWD Life Science Co. Ltd, China). La temperatura corporal de los animales se mantuvo entre 36-37°C con una manta eléctrica controlada por termostato. La mantención de la anestesia se logró administrando un cuarto de la dosis inicial de HC cada una hora durante todo el curso del experimento. Se

expuso el cráneo de los animales a través de una incisión en la piel y un pequeño agujero fue taladrado sobre el área del NAcc. Lentamente se introdujo una cánula de microdialisis (membrana de 2 mm; modelo CMA 11,6000 Dalton de Cut-Off, Solna, Suecia) en el cerebro a una velocidad de 1 mm/min usando las siguientes coordenadas de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson [31]: 1.4 mm anterior, 1.5 mm lateral y -7.8 mm ventral para el NAcc, respecto al punto bregma. Durante la implantación y a través de todo el experimento, la cánula de microdialisis fue perfundida con solución tampón Krebs-Ringer-Fosfato (KRF) a una velocidad de 1 μ L/min por medio de una bomba de infusión RWD (Modelo RWD 210, RWD Life Science Co. Ltd, China). Después del periodo de estabilización de 90 min, se recolectaron muestras de dializado cada 20 min y según los siguientes protocolos experimentales:

- *Liberación de DA en NAcc por estímulo depolarizante:* Una vez finalizado el periodo de estabilización se tomaron dos muestras basales de dializado entre los 0 y 40 minutos del periodo de recolección. Posteriormente y por un tiempo correspondiente a una ventana de recolección (20 min) se perfundió intra-NAcc una solución de KRF con una concentración de K^+ 70 mM (40 y 60 minutos). Después de finalizada la perfusión con KRF- K^+ se volvió a perfundir una solución de KRF normal por otros 40 minutos, recolectando muestras de dializado a los 80 y 100 minutos del periodo de recolección.

- *Liberación de DA en NAcc por administración intra-NAcc de anfetamina:* Una vez finalizado el periodo de estabilización se tomaron tres muestras basales de dializado entre los 0 y 60 minutos del periodo de recolección. Posteriormente y por un tiempo correspondiente a una ventana de recolección (20 min) se perfundió intra-NAcc una solución de KRF con una concentración de anfetamina 10 μ M (60 y 80 minutos). Después de finalizada la perfusión con KRF-anfetamina se volvió a perfundir una solución de KRF normal por otros 60 minutos, recolectando muestras de dializado a los 100, 120 y 140 minutos del periodo de recolección.

- *Liberación de DA en NAcc por administración sistémica de anfetamina:* Una vez finalizado el periodo de estabilización se tomaron dos muestras basales de dializado entre los 0 y 40 minutos del periodo de recolección. Posteriormente, al finalizar la recolección de la segunda muestra de dializado se inyectó por vía intra-peritoneal (i.p.) una dosis de anfetamina de 1.0 mg/Kg. El periodo de recolección de muestras de dializado posterior a la administración i.p. de anfetamina se extendió por 120 min, recolectando las muestras a los 60, 80, 100, 120, 140 y 160 minutos del periodo de recolección.

Cada una de las muestras de dializado de los protocolos antes descritos fueron recolectadas sobre 3 μ L de PCA 0.2 N para preservar la integridad de las muestras y congeladas a -80°C hasta el día de la cuantificación de la DA. Una vez finalizado cada uno de los experimentos, los animales fueron sacrificados por decapitación con guillotina y sus

cerebros rápidamente removidos y colocados en p-formaldehído al 4%. Posteriormente los cerebros fijados fueron cortados a un grosor de 50 μm , teñidos con cresil violeta y microscópicamente se verificó la localización de la cánula de microdiálisis (ver figura 1).

Figura 1:

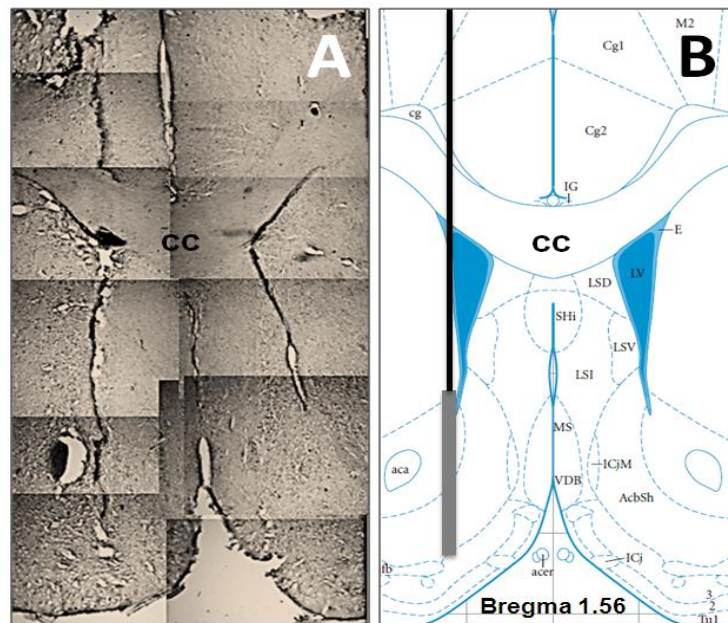


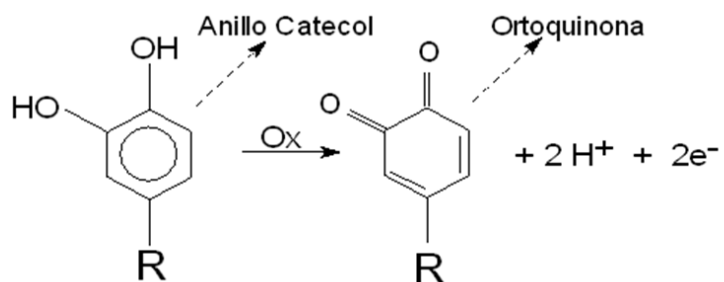
Figura 1 Microfotografía compuesta representativa de la postura de una cánula de microdiálisis (A) en Núcleo Accumbens y un esquema (B) adaptado y tomado del “Atlas de Cerebro de Rata” de Paxinos & Watson [31]. En este esquema se aprecia la postura teórica de la cánula de microdiálisis, representada por el rectángulo de color gris (membrana de diálisis).

Determinación de DA por Cromatografía Líquida de Alta Precisión Acoplada a Detección

Electroquímica:

Diez μL de cada solución filtrada (para medición de contenido) o de las muestras de dializado fueron inyectadas en un sistema de cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a un detector electroquímico (HPLC-EC) con la siguiente configuración: Inyector Rheodyne, una bomba isocrática (Modelo PU-2080 Plus, Jasco Co. Ltd., Tokyo, Japan), una columna C18 (Modelo MF-8912, BAS, West Lafayette, IN, USA) y un detector electroquímico (Modelo LC-4C, BAS, West Lafayette, IN, USA) configurado a un potencial de oxidación de 650 mV y una sensibilidad de 0.5 nA (ver Figura 2). La fase móvil que se utilizó para la determinación de DA fue bombeada a un flujo de 0.1 mL/min y tuvo la siguiente composición: 50 mM de NaH_2PO_4 , 1.0 mM de ácido 1-octanosulfónico, 0.27 mM de EDTA, 1.0% v/v de tetrahidrofurano y 3.5% v/v de acetonitrilo (ajustado a pH 2.8). Las áreas de los picos de DA y NA en las muestras fueron comparadas con estándares de referencia y se calcularon las concentraciones de DA y NA usando una curva de calibrado realizada en el programa cromatográfico (Program ChromPass, Jasco Co. Ltd., Tokyo, Japan). Bajo estas condiciones los tiempos de retención de NA y DA fue de 4 y 12 minutos, respectivamente.

Figura 2



R = -CH₂ - CH₂ - NH₂ = Dopamina (3-Hidroxitiramina, 3,4-dihidroxifeniletilamina)

R = -CH(OH) - CH₂ - NH₂ = Noradrenalina (Norepinefrina)

Figura 2 Esquema de la oxidación de catecolaminas que ocurre en el electrodo de trabajo del detector electroquímico. La oxidación de una molécula de catecolamina produce 2 electrones, esta corriente es directamente proporcional a la cantidad de moléculas de catecolaminas oxidadas.

Actividad Locomotora:

La actividad locomotora basal e inducida por anfetaminas fue medida en los grupos control y EV. Cada animal fue colocado en una jaula de prueba (44 de largo x 22 de altura x 28 cm de ancho) y para los primeros 30 min se registró la actividad locomotora basal. A los 30 minutos, cada animal se inyectó con una dosis de anfetamina (1 mg / Kg i.p. disuelto en solución salina fisiológica) y su actividad locomotora se registró durante 60 min. La actividad locomotora se registró por protocolo de Cámaras (IP) (Modelo LX-C202, Seguridad Lynx, China) fijas por encima de la jaula de ensayo y cada una conectada por internet a un ordenador en otra habitación. Los videos se analizaron con el sistema de seguimiento de vídeo ANY Maze (Stoelting Co., IL, EE.UU.) bajo licencia adquirida por el Dr. Alexies Dagnino-Subiabre. Las jaulas de ensayo fueron limpiadas y desinfectadas con una solución de etanol al 5% después de cada ensayo.

Cálculos y Análisis Estadístico:

Los resultados fueron expresados como valor promedio \pm error estándar medio (SEM). Las figuras que muestran un curso temporal de liberación de DA fueron analizadas por análisis de varianza de una cola (ANOVA) seguido por un post-test Newman-Keuls. Este análisis permitió establecer diferencias entre un valor estimulado y sus respectivos basales.

Las figuras que muestran un curso temporal de locomoción fueron analizadas por análisis de varianza de dos colas (ANOVA). Las diferencias entre el grupo control y tratamiento fueron analizadas por test-t de student's no-pareado y la diferencia estadísticamente significativa se estableció cuando el valor de p fue menor que 0,05. Todos los análisis

estadísticos fueron realizados con el programa GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTADOS

Evaluación de los Niveles Séricos de las Hormonas Sexuales y del Tamaño de los Órganos Reproductivos Sensibles a los Estrógenos: Una Medida de la Eficacia de la Administración Neonatal de EV.

La tabla 1 muestra los efectos de la administración de EV en PND1, sobre el peso del ovario izquierdo, útero y glándula pituitaria al PND60-62, siendo estos tejidos ricos en receptores de estrógeno y sensibles a la estrogenización neonatal persistente. Como se puede observar en la tabla 1 se produce una disminución significativa en el peso de estos órganos reproductivos sensibles a la acción de EV durante las primeras 12 horas de vida respecto a las ratas del grupo control. Con respecto a las hormonas sexuales, la exposición a EV en PND1 disminuye los niveles séricos de progesterona, sin afectar los niveles séricos de estradiol.

Tabla 1:

Tejido u Hormona	Control			Estrogenizada			P value
	Promedio	SEM	n	Promedio	SEM	n	
Peso del Ovario (mg)	40.23	1.61	7	7.36	0.72	7	< 0.0001
Peso del Útero (mg)	331.94	16.13	7	136.87	8.40	7	< 0.0001
Peso de la Hipófisis (mg)	12.45	0.48	7	7.21	0.19	7	< 0.0001
Progesterona en Suero (ng/mL)	6.82	0.92	7	1.09	0.22	7	< 0.0001
Estradiol en Suero (pg/mL)	44.40	3.91	7	63.17	13.28	7	0.1166

Tabla 1. La administración neonatal de EV al PND1 produjo una disminución significativa del peso del ovario y útero al PND60-62. Además, los niveles de progesterona sérica disminuyeron en ratas del grupo EV en comparación con las ratas del grupo control. Por otro lado, los niveles séricos de estradiol fueron similares en ambos grupos experimentales al PND60-62.

Evaluación del Índice Androgénico, como un Parámetro de Medición de un Posible Efecto Anabólico Producido por la Administración Neonatal de EV y del Peso de la Hipófisis, como Medida de Eficacia de la Estrogenización en Tejido no Reproductivo.

En relación al índice androgénico (parámetro que relaciona el cociente entre el peso del músculo *tibialis* y el peso corporal de cada animal), que fisiológicamente representa el efecto anabólico de las hormonas androgénicas, no observamos diferencias significativas de este índice al PND60 en las hembras expuestas a EV (0.00158 ± 0.00003) comparado con las hembras control (0.00162 ± 0.00003) (Gráfico 1, Panel A). Asimismo, al PND60 no observamos en los machos expuestos a EV al PND1 diferencias estadísticamente significativas al PND60 (0.00164 ± 0.00003) con respecto a los machos control (0.00164 ± 0.00005) (Gráfico 1, Panel B).

Respecto al efecto sobre el tamaño de la hipófisis (otro órgano sensible a la acción de estrógenos), se pudo observar que en las ratas hembras expuestas a EV hubo una disminución significativa del peso de la hipófisis de las ratas hembras EV (7.21 ± 0.19 mg) con respecto a las ratas control (12.45 ± 0.48 mg). No se observaron cambios estadísticamente significativos en ratas machos EV (11.88 ± 0.28 mg) respecto a las ratas machos control (11.89 ± 0.28 mg) (Gráfico 1, Panel C).

Gráfico 1:

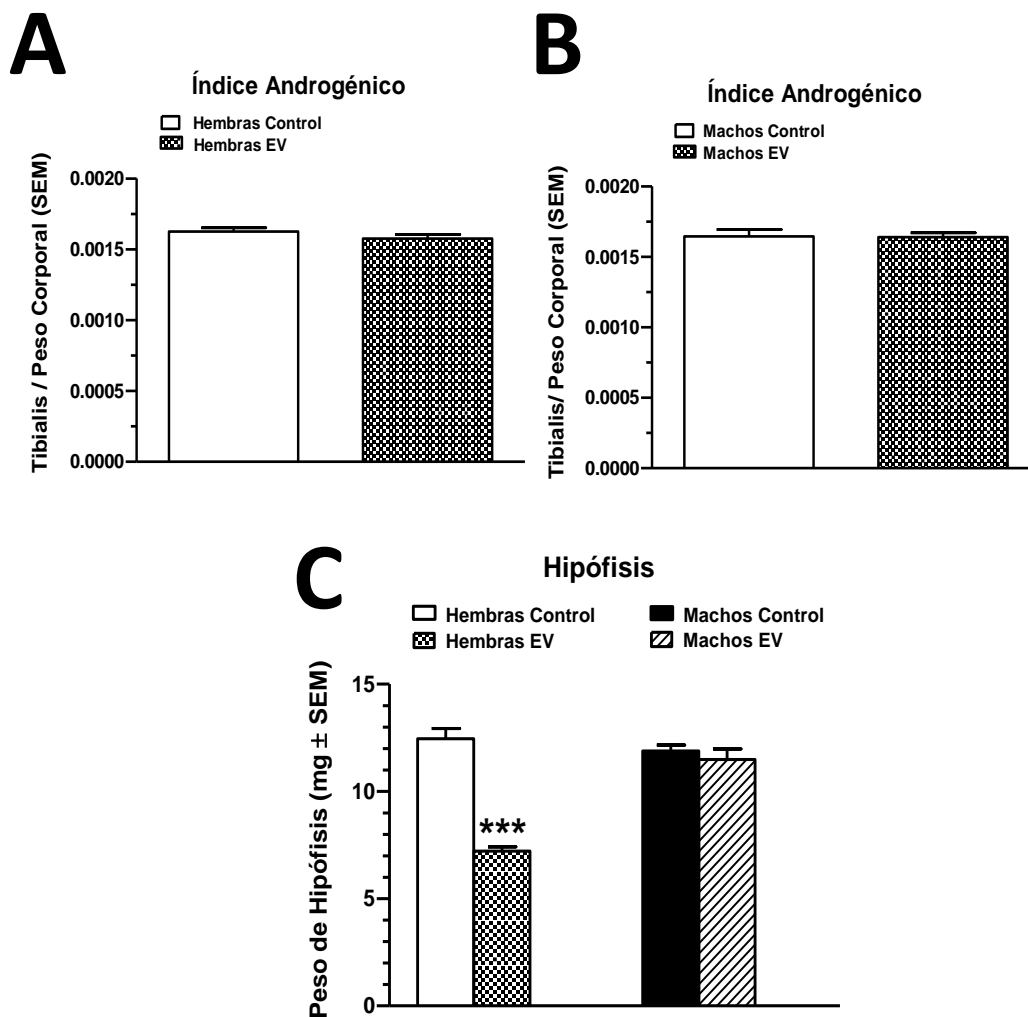


Gráfico 1. La administración de EV al PND1 no afectó el índice androgénico (cociente entre el peso del músculo tibial y el peso corporal del animal) de ratas hembras (A) y machos (B) de los grupos control y tratamiento al PND60-62. Sin embargo, a nivel de la hipófisis se observó una disminución significativa de su peso al PND60-62 en ratas hembras estrogenizadas (C).

Evaluación de las Curvas de Ganancia de Peso de Ratas Hembras y Machos Control y Tratadas Durante las Primeras Horas de Vida con EV.

Dentro de los cambios observados producto de la administración neonatal de EV se observó que no hubo cambios estadísticamente significativos en las curvas de ganancia de peso al comparar animales control con los tratados con EV (ver gráfico 2 panel A y B).

Gráfico 2:

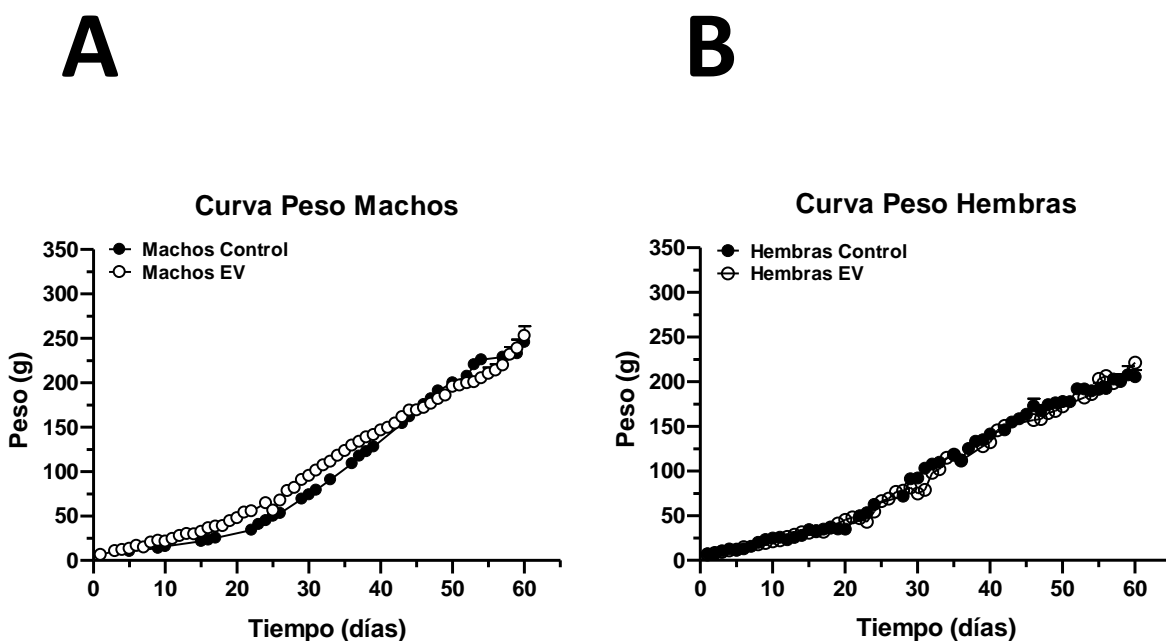


Gráfico 2. Curvas de ganancia de peso de ratas machos (A) y ratas hembras (B) de los grupos control y tratamiento (administración neonatal de EV al PND1). Machos control n=8, Machos EV n=9, Hembras Control n=12 y Hembras EV= 13.

Efectos sobre la Funcionalidad Reproductiva de Ratas Adultas Control y Tratadas con EV al PND1: Ciclicidad Estral y Apertura Vaginal.

A nivel reproductivo encontramos que la administración neonatal de EV produce a largo plazo en ratas hembras un adelantamiento de la apertura vaginal en el grupo EV al PND26 (Gráfico 3B), respecto a las ratas hembras control que recibieron la administración de aceite de maíz y que presentan una apertura vaginal del 100% al PND37 (Gráfico 3A). Además en el Gráfico 3B podemos observar una ausencia de la actividad cíclica estral desde el PND40 al PND60. Mientras que ciclicidad estral en ratas control fue normal con ciclos que duraron entre 4 a 5 días (Gráfico 3A).

Gráfico 3:

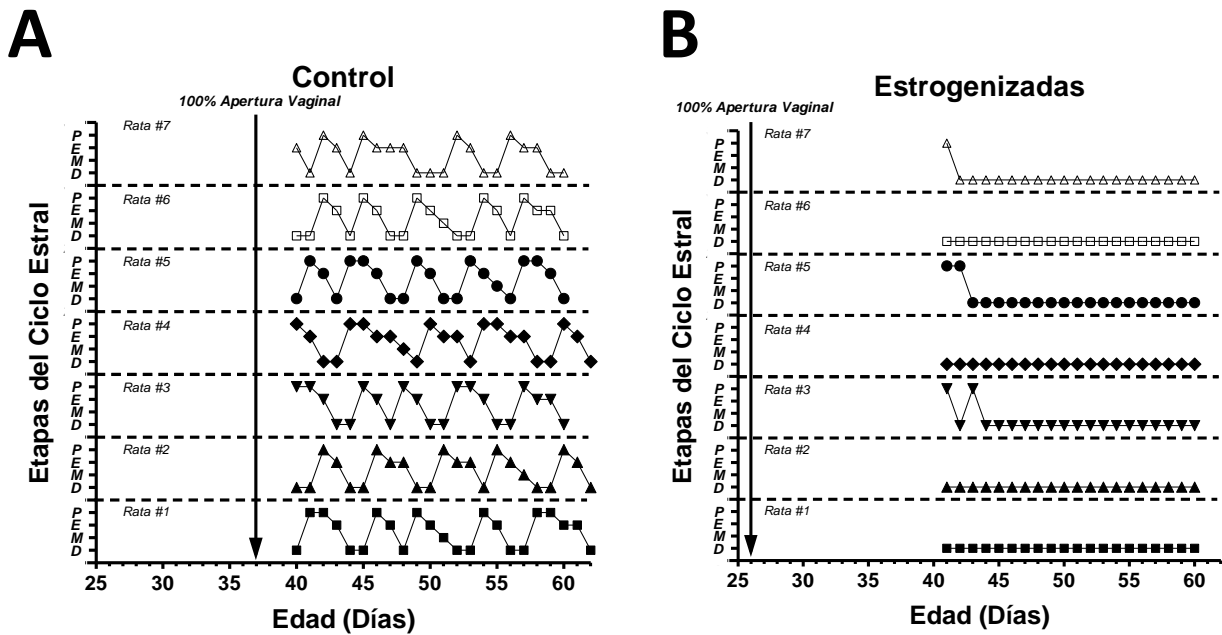


Gráfico 3. Registros de la ciclicidad estral y apertura vaginal en ratas hembras Control y EV, respectivamente. n=7 para ambos grupos.

Contenido de Neurotransmisores Catecolaminérgicos en SN-VTA y Cuerpo Estriado al PND60-62 de Ratras Hembras Control y Tratadas con EV al PND1: Estudios Neuroquímicos *in vitro*.

Respecto al contenido de DA, se observó que la administración neonatal de EV produjo un aumento significativo en el contenido de DA en SN-VTA (23130 ± 5559 pg/mg de proteína)(Gráfico 4, Panel B) y en CE (137100 ± 11050 pg/mg de proteína) (Gráfico 4, Panel A) al PND60-62 respecto a ratas hembras control (SN-VTA: 11510 ± 1591 pg/mg de proteína(Gráfico 4, Panel B); CE 111400 ± 6708 pg/mg de proteína) (Gráfico 4, Panel A).

Respecto al contenido de NA, se observó que la administración neonatal de EV produjo un aumento significativo en el contenido de NA sólo en el CE al PND60-62 de ratas hembras tratadas con EV (17950 ± 1536 pg/mg de proteína) versus ratas hembras control (8911 ± 1434 pg/mg de proteína) (Gráfico 4, Panel C). Respecto al contenido de NA en SN-VTA no se observaron diferencias estadísticamente significativas al PND60-62 de ratas hembras tratadas con EV (16700 ± 4549 pg/mg de proteína) versus ratas hembras control (9408 ± 1514 pg/mg de proteína) (Gráfico 4, Panel D).

Gráfico 4:

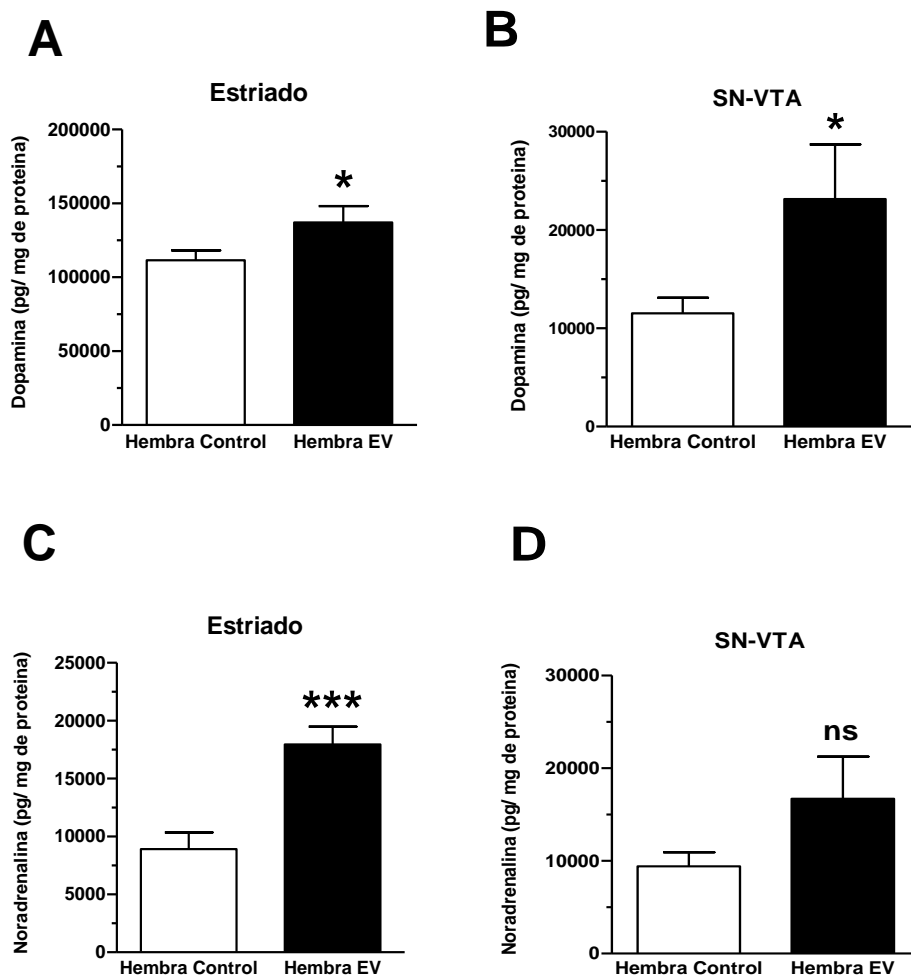


Gráfico 4. Efecto de la exposición neonatal a estradiol valerato (EV) de ratas hembras al PND1, sobre la concentración de DA (A y B) y NA (C y D) en Cuerpo Estriado (A y C) y sustancia nigra – área tegmental ventral (B y D). Los resultados fueron expresados como pg/mg de proteína que representan la media \pm SEM ($n=7$ por grupo. * $P<0.05$, * $P<0.0001$ y ns: no significativo).**

Contenido de Metabolitos de DA en SN-VTA y CE al PND60-62 de Ratas Hembras Control y Tratadas con EV al PND1: Estudios Neuroquímicos *in vitro*.

En cuanto a los metabolitos de DA al PND60-62 en SN-VTA sólo se encontró un ligero aumento en el contenido de 3- Metoxitiramina (3-MT) en ratas tratadas con EV al PND1 (Tabla 2). El cuociente entre el contenido total de los metabolitos de DA (Ácido 3,4-Dihidroxifenilacetico (DOPAC) + Ácido Homovanílico (HVA) + 3-MT) y DA mostró una recaptación reducida en ratas tratadas con EV al PND1 (Tabla 2). Respecto al contenido de metabolitos de DA en el Cuerpo Estriado no se observaron cambios estadísticamente significativos respecto a ratas control (Tabla 3).

Tabla 2:

Neurotransmisores de SN-VTA (pg/mg de proteína)	Control			EV			Valor P
	Promedio	Desviación	n	Promedio	Desviación	n	
DA	11 509.9	1 590.7	7	23 133.9	5 559.5	7	0.0337*
DOPAC	4 993.6	1 267.9	7	8 598.4	2 514.1	7	0.1123
HVA	1 896.4	467.3	7	2 882.1	640.8	7	0.1188
3-MT	2 244.1	259.1	7	3 990.9	378.1	7	0.0448*
[DOPAC/DA]	0.4026	0.0628	7	0.3590	0.0297	7	0.2711
[HVA/DA]	0.1544	0.0256	7	0.1281	0.0129	7	0.1884
[3-MT/DA]	0.2163	0.0413	7	0.1573	0.0236	7	0.1194
[Metabolitos/DA]	0.7876	0.0686	7	0.6441	0.0359	7	0.0445*

Tabla 2. Niveles de monoaminas en Sustancia Nigra-Área Tegmental Ventral (SN-VTA) al PND60-62 de ratas hembras adultas control y tratadas con EV al PND1. DA: Dopamina; DOPAC: ácido 3,4-dihidroxifenilacetico; HVA: ácido homovanílico; 3-MT: 3-metoxitiramina; DOPAC + HVA + 3MT: Metabolitos de DA. *P < 0.05 comparados con el grupo control.

Tabla 3:

Neurotransmisores del Estriado (pg/mg de proteína)	Control			EV			Valor P
	Promedio	Desviación	n	Promedio	Desviación	n	
DA	111 448.4	6 707.6	7	137 070.0	11 053.8	7	0.0355*
DOPAC	29 427.4	3 269.6	7	39 891.6	5 780.1	7	0.0705
HVA	9 379.6	1 004.0	7	12 429.7	3 223.0	7	0.1920
3-MT	5 973.0	759.5	7	6 772.4	1 401.1	7	0.3125
[DOPAC/DA]	0.2619	0.0245	7	0.2890	0.0371	7	0.2763
[HVA/DA]	0.0831	0.0062	7	0.0847	0.0138	7	0.4597
[3-MT/DA]	0.0526	0.0050	7	0.0473	0.0057	7	0.2491
[Metabolitos/DA]	0.3974	0.0346	7	0.4211	0.0470	7	0.3457

Tabla 3. Niveles de monoaminas en Cuerpo Estriado al PND60-62 de ratas hembras adultas control y tratadas con EV al PND1. DA: Dopamina; DOPAC: ácido 3,4-dihidroxifenilacetico; HVA: ácido homovanílico; 3-MT: 3-metoxitiramina; DOPAC + HVA + 3MT: Metabolitos de DA. *P < 0.05 comparados con el grupo control.

Contenido de DA en SN-VTA y Cuerpo Estriado al PND60-62 de Ratas Machos Control y Tratadas con EV al PND1: Estudios Neuroquímicos *in vitro*.

Respecto al contenido de DA, se observó que la administración neonatal de EV produjo un aumento significativo sólo en el contenido de DA en SN-VTA de ratas machos tratadas con EV al PND1 (20740 ± 4007 pg/mg de proteína) versus ratas machos control (7985 ± 2030 pg/mg de proteína) (Gráfico 5, Panel B). Respecto al contenido de DA en Cuerpo Estriado no se observaron diferencias estadísticamente significativas al PND60-62 de ratas machos tratadas con EV (143200 ± 23860 pg/mg de proteína) versus ratas machos control (149300 ± 22620 pg/mg de proteína) (Gráfico 5, Panel A).

Gráfico 5:

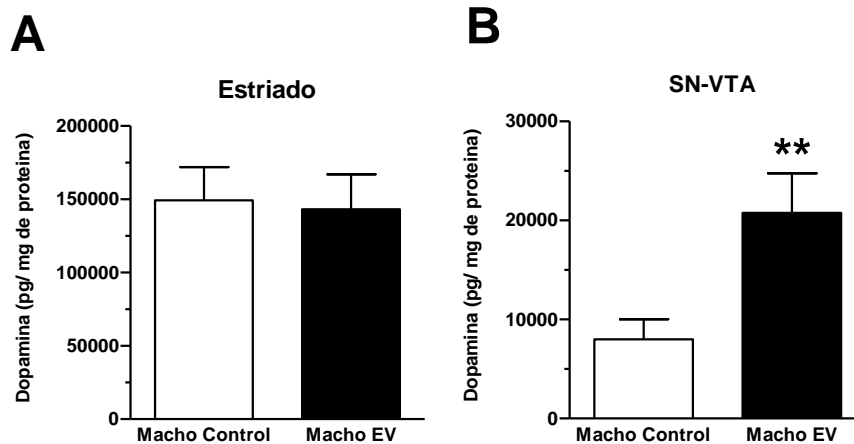


Gráfico 5. Efecto de la exposición neonatal a estradiol valerato (EV) de ratas macho al PND1 en el contenido de dopamina en Cuerpo Estriado (A) y Substantia Nigra – Área Tegmental Ventral (B). Resultados expresados como pg/mg de proteína que representan la media \pm SEM ($n=7$ por macho control and $n=6$ por macho EV-1). ** $P<0.01$

Actividad Locomotora Basal e Inducida por la Administración Sistémica de Anfetamina en Ratras Hembras Control y Tratadas con EV al PND1: Estudios Conductuales.

Se observó que la actividad locomotora basal no cambia entre los grupos experimentales durante los primeros 30 min. Sin embargo, en la actividad locomotora inducida por anfetamina (30-90 min) se observa una ausencia de respuesta a la administración de anfetamina en las ratas EV en comparación con las ratas control. El análisis ANOVA de 2 vías de medidas repetidas mostró diferencias significativas al comparar ratas control vs EV: tratamiento [$F(12,76) = 16,77, P < 0,0001$], el tiempo [$F(11,12) = 14,62, P < 0,0001$] y la interacción [$F(1,607) = 2,112, P < 0,0001$] (Gráfico 6, Panel A).

Gráfico 6:

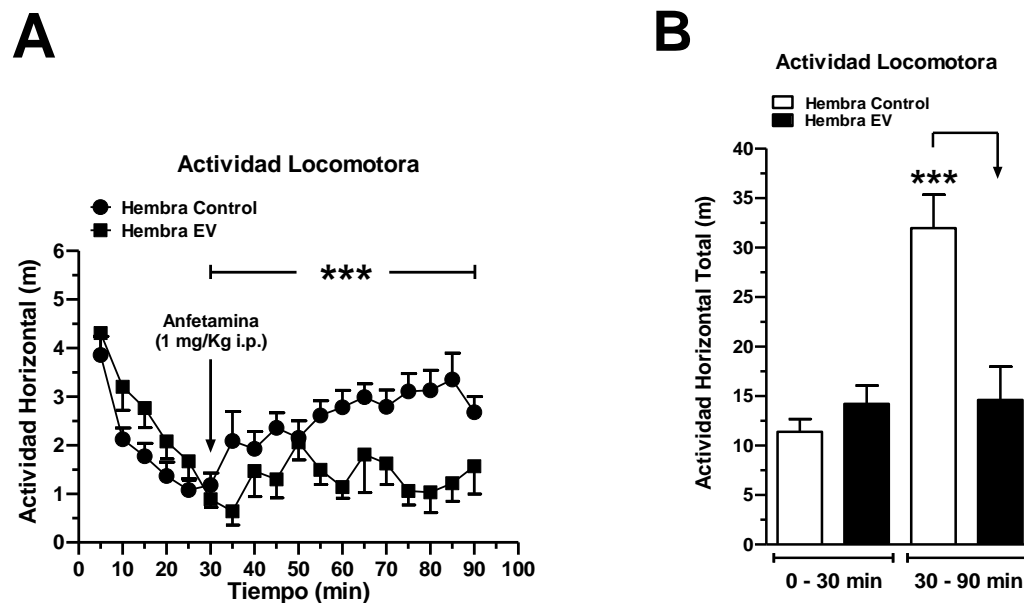


Gráfico 6. Efecto de la exposición neonatal a estradiol valerato (EV) al PND1 sobre la actividad locomotora inducida por la administración de anfetamina (1 mg/Kg i.p.) en ratas hembras control y tratadas con EV al PND60-62. Resultados expresados como media \pm SEM ($n=11$ hembras control, $n=5$ hembras EV). A: Actividad locomotora basal e inducida por anfetamina (ANOVA de 2 vías, $*P < 0.0001$). B: Actividad locomotora acumulativa (t- test, $***P < 0.0001$).**

Actividad Locomotora Basal e Inducida por la Administración Sistémica de Anfetamina en Ratas Machos Control y Tratadas con EV al PND1: Estudios Conductuales.

Se observó que la actividad locomotora basal no cambia entre los grupos durante los primeros 30 min. Posteriormente, la actividad locomotora inducida por anfetamina (30-90 min) no presenta diferencias significativas entre los grupos de machos EV y control. El análisis ANOVA de 2 vías de medidas repetidas Bonferroni post-test no mostró un efecto significativo del tratamiento con EV al comparar ratas control vs EV: tratamiento [F (1,162) = 0.00057, $P = 0.9809$], el tiempo [F (17,162) = 4.693, $P < 0.0001$] y la interacción [F (17,162) = 1.769, $P = 0.0361$] (Gráfico 7, Panel A).

Gráfico 7:

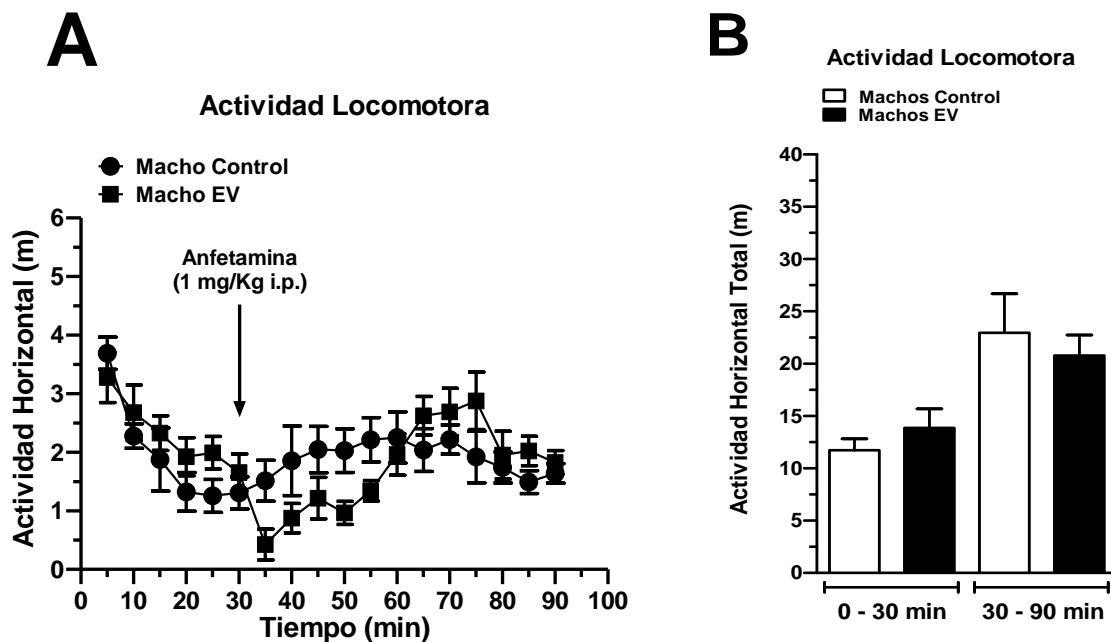
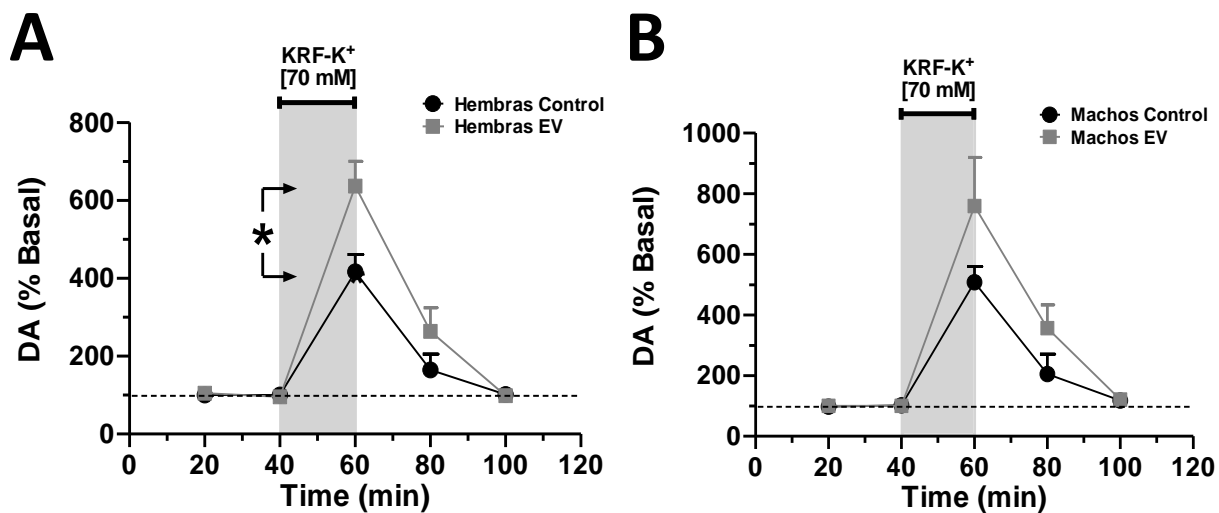


Gráfico 7. Efecto de la exposición neonatal a estradiol valerato (EV) al PND1 sobre la actividad locomotora inducida por la administración de anfetamina (1 mg/Kg i.p.) en ratas machos control y tratadas al PND60-62. Resultados expresados como media \pm SEM ($n=4$ machos control, $n=7$ machos EV). A: Actividad locomotora basal e inducida por anfetamina. B: Actividad locomotora acumulativa.

Liberación de DA en NAcc Inducida por K⁺ [70 mM] al PND60-62 de Ratas Control y Tratadas con EV al PND1: Estudios Neuroquímicos *in vivo*.

Respecto a la liberación de DA en NAcc se observó que el estímulo depolarizante con K⁺ [70 mM] produjo en cada grupo experimental un aumento significativo en la liberación de DA respecto a su propia liberación basal. Respecto a la comparación entre los grupos experimentales sobre la liberación de DA estimulada por K⁺ [70 mM] al PND60 se observó un aumento estadísticamente significativo a los 60 min en el grupo de ratas hembras tratadas con EV al PND1 (636.6 ± 63.7 % de la liberación basal) versus el grupo de ratas hembras control (416.3 ± 44.7 % de la liberación basal) ($P = 0.0178$) (Gráfico 8, Panel A). Sin embargo, este efecto no fue observado en el grupo de ratas machos tratadas con EV al PND1 (759.6 ± 160.0 % de la liberación basal) versus ratas machos control (508.2 ± 51.4 % de la liberación basal) ($P = 0.1144$) (Gráfico 8, Panel B).

Gráfico 8:



*Gráfico 8. Efecto de la exposición neonatal a estradiol valerato (EV) en PND1 sobre la liberación de dopamina (DA) inducida por K⁺ [70 mM] en el núcleo accumbens de ratas hembras y machos adultos. Los resultados se expresan como % de la liberación basal \pm SEM (n = 6 y 6 para hembras control y EV, respectivamente. N = 6 y 4 para machos control y EV, respectivamente). * P < 0.05.*

Liberación de DA en NAcc Inducida por Anfetamina Intra-NAcc al PND60-62 de Ratas Control y Tratadas con EV al PND1: Estudios Neuroquímicos *in vivo*.

Respecto a la liberación de DA en NAcc se observó que el estímulo con anfetamina Intra-NAcc [10 μ M] produjo en cada grupo experimental un aumento significativo en la liberación de DA respecto a su propia liberación basal. Respecto a la liberación de DA en NAcc se observó que el estímulo con anfetamina Intra-NAcc [10 μ M] produjo un aumento estadísticamente significativo a los 80 min en el grupo de ratas hembras control (401.7 ± 48.0 % de la liberación basal) versus ratas hembras tratadas con EV al PND1 (196.92 ± 64.92 % de la liberación basal) ($P = 0.0443$) (Gráfico 9, Panel A). Sin embargo, este efecto no fue observado en el grupo de ratas machos tratadas con EV al PND1 (312.04 ± 40.28 % de la liberación basal) versus ratas machos control (258.49 ± 11.68 % de la liberación basal) ($P = 0.3212$) (Gráfico 9, Panel B).

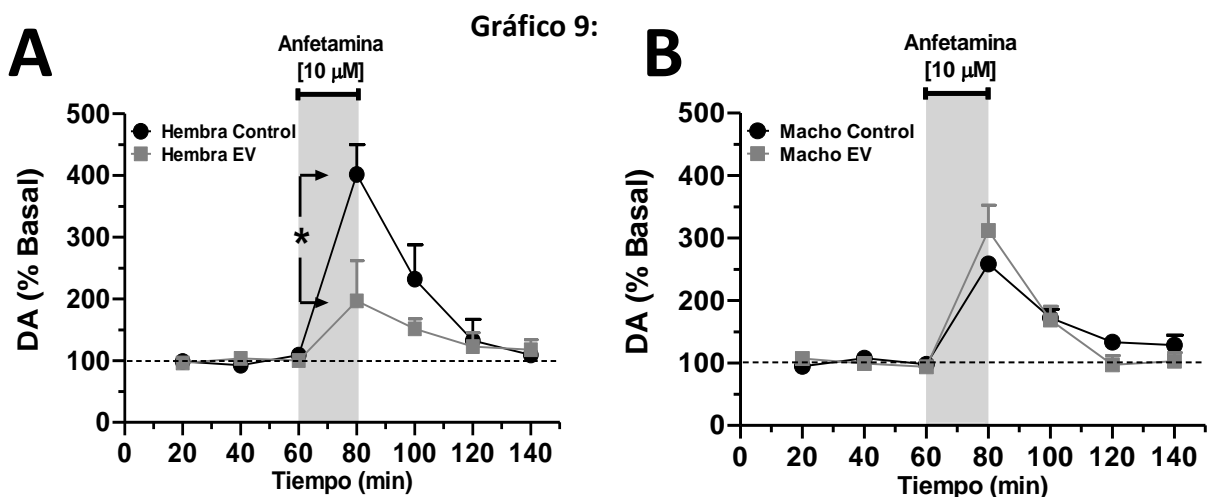


Gráfico 9. Efecto de la exposición neonatal de estradiol valerato (EV) al PND1 en liberación de dopamina (DA) en Núcleo Accumbens inducida por la perfusión de anfetamina [10 μ M] de ratas hembras (A) o machos (B) adultas. Resultados expresados como media \pm SEM ($n=4$ hembras control, $n=4$ hembras EV-1, $n=3$ machos control y $n=4$ machos EV-1). *t*-Test fue utilizado para comparar valores estimulados ($*P<0.05$).

Liberación de DA en NAcc Inducida por Anfetamina Sistémica al PND60-62 de Ratas Hembras y Machos Control y Tratadas con EV al PND1: Estudios Neuroquímicos *in vivo*.

Respecto a la liberación de DA en NAcc se observó que la administración sistémica de anfetamina (1.0 mg/Kg i.p.) produjo en cada grupo experimental un aumento significativo en la liberación de DA respecto a su propia liberación basal. Respecto a la comparación entre los grupos experimentales, pudimos observar que la liberación de DA estimulada por anfetamina al PND60-62 tuvo una respuesta significativamente menor a los 80 min en ratas hembras tratadas con EV al PND1 (183.1 ± 42.0 % de la liberación basal) versus ratas hembras control (383.0 ± 24.0 % de la liberación basal) ($P = 0.0020$) (Gráfico 10, Panel A). Respecto al efecto de la administración sistémica de anfetamina (1.0 mg/Kg i.p.) sobre la liberación de DA en NAcc en ratas machos adultas, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de ratas machos tratadas con EV al PND1 (682.2 ± 174.6 % de la liberación basal) versus el grupo de ratas machos control (596.1 ± 210.6 % de la liberación basal) ($P = 0.7747$) (Gráfico 10, Panel B).

Gráfico 10:

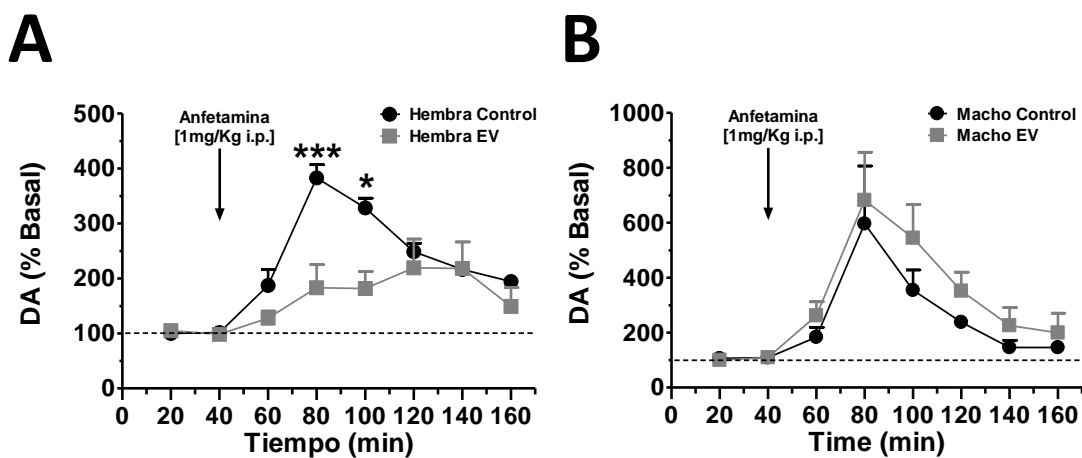


Gráfico 10. Efecto de la exposición neonatal de estradiol valerato (EV) al PND1 en liberación de dopamina en Núcleo Accumbens inducida por la administración sistémica de anfetamina (1 mg/Kg i.p.) de ratas hembras (A) o machos (B) adultos. Resultados expresados como media \pm SEM ($n=6$ hembras control, $n=6$ hembras EV, $n=2$ machos control y $n=3$ machos EV). t-Test fue utilizado para comparar valores estimulados (** $P<0.001$; * $P<0.05$).

DISCUSIÓN

Los presentes resultados demuestran parcialmente el cumplimiento de nuestra hipótesis inicial, puesto que las ratas hembras y machos que fueron expuestas a EV al PND1 presentan mayor contenido de DA en SN-VTA y mayor liberación de DA por estímulo depolarizante de K^+ [70 mM] al PND60-62. Sin embargo, en ratas hembras tratadas con EV al PND1 se observó que la liberación de DA al PND60-62 inducida por la administración de amfetamina (intra-NAcc y sistémica) fue menor que la observada en ratas hembras control que recibieron sólo la inyección de 50 μ L de aceite de maíz. En este sentido, esta disminución en la liberación de DA inducida por amfetamina, se relacionó con una disminución de la actividad locomotora inducida por la misma droga. Estos resultados dan cuenta que la administración neonatal de EV podrían producir, a largo plazo en ratas hembras, alteraciones importantes en proteínas que regulan la actividad de neuronas dopaminérgicas, como TH y DAT.

Caracterización del Modelo de Administración Neonatal de EV:

Uno de los primeros experimentos realizados en esta tesis fue la caracterización del modelo de administración neonatal de EV. Este modelo ha sido aplicado en otros laboratorios del país [5], por lo tanto fue muy importante para el desarrollo de esta tesis el estudiar si los efectos obtenidos a nivel de órganos sensibles a la acción de EV, eran similares a los descritos en la literatura.

Uno de los parámetros medidos fue el índice androgénico, que corresponde a un parámetro que refleja la actividad anabólica de alguna sustancia. En este sentido, se

observó que tanto en ratas hembras y machos tratadas con EV durante las primeras horas de vida, no hubo un cambio significativo en el índice androgénico respecto a los grupos control (Gráfico 1, Panel A y B). Esta ausencia de efecto puede estar relacionada principalmente a que la hormona sexual descrita en la literatura que produce anabolismo es la testosterona (T) [32,33]. La T favorece la captación de aminoácidos en la musculatura esquelética, ya que esta posee receptores para andrógenos (AR) [32,33]. En la literatura se ha descrito que en ratas hembras tratadas durante las primeras horas de vida con T propionato, se produce un aumento del índice androgénico en la vida adulta [6].

Respecto a las curvas de ganancia de peso, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (Gráfico 2, Panel A y B). Cabe señalar que los pesos promedios al PND60 fueron similares a los descritos por los principales laboratorios productores de animales de experimentación [43]. Por lo tanto, en esta tesis se trabajó con animales con curvas de crecimiento normal.

A nivel del sistema reproductivo, pudimos observar que en ratas hembras tratadas durante las primeras horas de vida con EV, se produjo a largo plazo una atrofia de tejidos y glándulas que forman parte de la regulación endocrina de las gónadas. Por ejemplo, nuestro modelo de administración neonatal de EV demostró producir en hembras una disminución de tamaño de la hipófisis (Gráfico 1, Panel C), del tamaño de ovario izquierdo (Tabla 1) y del tamaño del útero (Tabla 1). Todos estos tejidos expresan altamente ERs [32,33] por lo tanto son susceptibles de sufrir alteraciones por la administración neonatal de EV. La reducción del tamaño del ovario (Tabla 1) con la administración neonatal de EV

ha sido descrita en la literatura [5] y se asocia morfológicamente a una ausencia de cuerpos lúteos (CL) y a la presencia de quistes ováricos [5,6]. Por otro lado, esta ausencia de CL es responsable de la disminución sérica de Progesterona observada en esta tesis (Tabla 1). Cabe señalar que en la hembra los CL son las principales estructuras productoras de progesterona y responsable del aumento de los niveles plasmático de esta hormona durante la fase lútea del ciclo menstrual [32,33].

Respecto al tamaño de la hipófisis, se observó una disminución significativa de su peso en hembras tratadas con EV y no en machos tratados con EV. En la hembra, las células gonadotropas de la hipófisis tienen una alta expresión de ERs que son responsables de la retroalimentación negativa y positiva que se observa y describe en la literatura [32,33]. A nivel fisiopatológico, la atrofia observada en la hipófisis de las ratas hembras tratadas con EV podría ejercer un control endocrino insuficiente sobre las gónadas, que sería responsable de mantener las alteraciones morfológicas y las alteraciones funcionales del tejido reproductivo. En este sentido, las ratas hembras tratadas con EV presentaron aciclicidad estral (Gráfico 3, Panel B) y adelantamiento de la apertura vaginal, que es un marcador de la llegada de la pubertad en la hembra. Este efecto ha sido demostrado anteriormente en la literatura [5,34] y puede ser relacionado patológicamente con una pubertad temprana que produce alteraciones reproductivas a largo plazo.

En resumen, los resultados obtenidos a nivel reproductivo pueden integrarse con los resultados obtenidos a nivel del SNC a través de 2 maneras: En primer lugar, las anomalías reproductivas producidas a largo plazo por la exposición neonatal a EV

producen niveles séricos de progesterona más bajos, los cuales podrían afectar los circuitos cerebrales dopaminérgicos cuando las ratas son adultas. En segundo lugar, los niveles elevados de estradiol durante la etapa neonatal pueden producir una interrupción del normal desarrollo de los circuitos cerebrales dopaminérgicos que podrían ser responsable de los efectos a largo plazo y que se discuten a continuación.

Contenido de DA y Metabolitos en las Vías Nigroestriatal y Mesolímbica de Ratas Adultas Expuestas a la Administración Neonatal a EV:

Los resultados obtenidos en esta tesis nos demuestran que la administración neonatal de EV al PND1, produce un aumento del contenido de DA en SN-VTA de ratas hembras (Gráfico 4, Panel B) y machos adultos (Gráfico 5, Panel B) respecto a los grupos control. Sin embargo, sólo observamos un incremento del contenido de DA en CE de ratas hembras estrogenizadas (Gráfico 4, Panel A). Interesantemente, se observó que las mediciones del contenido de DA en las áreas dopaminérgicas cerebrales al PND60-62, se realizaron en presencia de una concentración sérica de E2 similar al grupo control (Tabla 1), lo que indicaría que la administración de EV al PND1 causó cambios a largo plazo en el contenido de DA, que son independientes de la concentración sérica de E2 al PND60-62. En este sentido, una posibilidad para explicar este efecto sobre el contenido de DA puede deberse a cambios epigenéticos perdurables en las enzimas de síntesis de catecolaminas, como la TH. Recientemente, se ha demostrado en estudios *in vitro* que el gen de TH tiene elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en su promotor y que el E2 activa la

transcripción de TH a través del ER α [35]. Además, a través de estudios de inmunohistoquímica para TH en SN-VTA de roedores hembras adultas, demostraron que E2 modula positivamente la expresión de TH [17].

Nuestros resultados sugieren que el aumento en el contenido de DA en las áreas dopaminérgicas estudiadas en esta tesis, podrían ser producidos por cambios epigenéticos a largo plazo que facilitarían el aumento de la expresión de TH en las neuronas dopaminérgicas. Algunos de estos cambios epigenéticos a largo plazo podrían ser sobre ERs, ya que se ha demostrado que los patrones de metilación de los ERs cambian al PND60 en ratas hembras que han sido expuestas durante las primeras horas de vida a E2 [36]. En este contexto, el porcentaje de metilación de ER α en el área preóptica y de ER β en el hipotálamo mediobasal, disminuye en hembras estrogenizadas versus hembras control [36]. Esta menor metilación de los genes de ERs podría conducir a un aumento de la transcripción de los mRNA de los ERs, incrementando su traducción a proteínas, y así obtener un mayor efecto del E2 circulante sobre sus receptores y favoreciendo la transcripción de genes inducibles por estrógenos, como el gen de la TH [35,37].

No sólo se observó un aumento del contenido de DA en CE, sino también se observó un aumento del contenido de NA en CE de ratas hembras estrogenizadas (Gráfico 4, Panel C). La DA es sustrato para que la DA- β -hidroxilasa la transforme a NA. Asimismo, áreas noradrenérgicas como el locus ceruleus también expresan TH, lo que podría llevar a síntesis de mayor cantidad de DA y posteriormente a mayor síntesis de NA en áreas subcorticales, como Amígdala, Lecho de la Estría Terminal y CE, entre otros.

Respecto a la metabolización de DA, no observamos cambios estadísticamente significativos en metabolitos a nivel del CE de ratas hembras tratadas con EV (Tabla 3). Sin embargo a nivel de SN-VTA, se pudo observar un incremento del metabolito 3-Metoxi-Tiramina y una disminución del cociente entre el contenido total de los metabolitos de DA y el contenido de DA (Tabla 2). Este cociente refleja una leve pero significativa disminución en la recaptura de DA, que podría representar cambios a nivel de DAT.

Actividad Locomotora Basal e Inducida por Anfetamina en Ratas Adultas Expuestas a la Administración Neonatal a EV:

Como revisamos anteriormente, la exposición neonatal a EV produjo un aumento del contenido de DA en áreas cerebrales dopaminérgicas involucradas en la producción de movimiento (vía nigroestriatal) y recompensa (vía mesocorticolímbica). Por este motivo se decidió evaluar si frente a la exposición a una droga psicotrópica que libera DA, se produce un incremento en la actividad locomotora. El blanco molecular del mecanismo de acción de la anfetamina es el DAT, el cual se encarga de recapturar la DA del espacio sináptico e introducirla nuevamente a la neurona presináptica, donde es nuevamente almacenada en vesículas o degradada a nivel citoplasmático por la enzima intracelular monoamino-oxidasa (MAO), que la metaboliza a DOPAC. Cabe señalar que en el espacio sináptico, la COMT degrada la DA y regula el tiempo y la amplitud con que ésta puede ejercer su actividad sobre los receptores pre y postsináptico [38].

En los resultados obtenidos en esta tesis se observó que la actividad locomotora basal, en ratas hembras (Gráfico 6, Panel A) y machos adultos (Gráfico 7, Panel A) tratadas con EV, no fue diferente de sus respectivos grupos control. Sin embargo, la actividad locomotora inducida por anfetamina fue significativamente menor en ratas hembras estrogenizadas versus ratas control (Gráfico 6, Panel A y B). Mientras que en ratas machos tratadas con EV, no hubo cambios estadísticamente significativos en la actividad locomotora inducida por anfetamina respecto a su grupo control (Gráfico 7, Panel A y B). Estos resultados son muy interesantes, ya que en ratas hembras adultas tratadas al PND1 con EV se observó un mayor contenido de DA en áreas dopaminérgicas, sin embargo la liberación de este contenido de DA inducido por anfetamina es mucho menor.

La anfetamina, al igual que la cocaína, aumenta los niveles extracelulares de DA, pero con un perfil farmacodinámico de acción muy distinto. La cocaína y el metilfenidato, bloquean DAT produciendo acumulación de este neurotransmisor en el espacio sináptico luego de su liberación. Por el contrario, la anfetamina es sustrato del DAT e invierte el flujo de DA a través de los transportadores vesicular y de membrana produciendo un aumento de la liberación de DA desde las vesículas al citosol y desde el citosol al espacio sináptico [39]. De esta manera se produce un efecto independiente de la actividad basal de la neurona [40]. Por lo tanto, una posible explicación que de cuenta de esta ausencia de efecto de anfetamina en ratas hembras estrogenizadas, debería estar relacionada con alteraciones a nivel del funcionamiento o expresión del DAT. En este sentido, en la literatura se ha demostrado que la exposición neonatal de roedores a BPA, un disruptor endocrino con

actividad estrogénica, produce una reducción significativa de los niveles de la proteína [41] y mRNA [42] de DAT a nivel de CE. Actualmente, algunas de las proyecciones de los resultados de esta tesis han llevado a la realización de nuevas tesis que tienen por objetivo medir los niveles del mRNA de DAT en NAcc y CE de ratas tratadas con hormonas sexuales.

Liberación de DA en NAcc Inducida por Potasio en Ratas Adultas Expuestas a la Administración Neonatal a EV:

La liberación de DA en NAcc inducida por el estímulo depolarizante de K^+ (70 mM) al PND60-62, fue mayor en ratas hembras tratadas al PND1 con EV respecto a hembras control (Gráfico 8, Panel A). Sin embargo, en machos tratados con EV, sólo hubo una tendencia al aumento en la liberación de DA inducida por K^+ respecto machos control (Gráfico 8, Panel B). El efecto observado en hembras tratadas con EV sobre la liberación de DA en NAcc es consistente con los resultados del contenido de DA en VTA observados previamente (Gráfico 4, Panel B), ya que la liberación de DA en NAcc se produce desde terminales dopaminérgicos provenientes del VTA [9]. En este sentido, un mayor contenido de DA puede ser relacionado con una mayor liberación extracelular de DA frente a un estímulo depolarizante.

Liberación de DA en NAcc Inducida por Anfetamina en Ratas Adultas Expuestas a la Administración Neonatal a EV:

La anfetamina es un psicoestimulante que produce una liberación de DA en NAcc y CE [8] a través de un mecanismo independiente del tono de la neurona dopaminérgica y cuyo blanco molecular es el DAT [39,40]. En los resultados incluidos en esta tesis pudimos observar que en ratas hembras tratadas con EV al PND1, la liberación de DA inducida por la administración intra-NAcc (Gráfico 9, Panel A) y sistémica (Gráfico 10, Panel B) de anfetamina es menor al día PND60-62 con respecto a ratas hembras control. Sin embargo, este efecto no fue observado en ratas machos tratadas con EV al PND1 respecto a ratas machos control (Gráfico 9 y 10, Paneles B). Este resultado es muy interesante, ya que a pesar de que las ratas tratadas con EV al PND1 tienen un mayor contenido de DA a nivel de SN-VTA y CE, la liberación de DA dependiente de la reversión del DAT es mucho menor y se correlaciona directamente con la menor actividad locomotora observada al PND60-62 en ratas hembras tratadas con EV al PND1 (Gráfico 6). Una posible explicación a esta ausencia de efecto de anfetamina podría ser asociada a una degradación del fármaco anfetamina por hidrólisis de esta en el medio acuoso. Sin embargo, esta posibilidad debe quedar descartada, ya que la anfetamina administrada en ratas hembras control produce un aumento de la liberación de DA en NAcc y un aumento de la actividad locomotora inducida por esta droga psicoestimulante.

Otra posibilidad que de cuenta de esta ausencia de efecto en ratas hembras tratadas con EV al PND1 podría ser la reducción de los niveles de DAT en la membrana del terminal, lo

cual se relacionaría con una menor disponibilidad sináptica de la proteína blanco para la acción de la anfetamina. En este sentido, en la literatura se ha demostrado que las hormonas sexuales de la hembra tienen una relación con la expresión del DAT, ya que la OVX de ratas de 3 meses de edad demostró por la técnica de autoradiografía una reducción significativamente de los niveles de DAT en el NAcc [21], mientras el reemplazo con E2 en ratas OVX restituye los niveles normales del DAT [21]. Sin embargo, ha sido descrito en la literatura que la exposición prenatal y postnatal a BPA (agonista parcial de ERs) disminuye la expresión de DAT en CE [41]. Por lo tanto, es posible que nuestra exposición neonatal a EV, produzca a largo plazo una programación que lleve a la disminución de la expresión de DAT en áreas dopaminérgicas cerebrales.

CONCLUSIONES

- 1.- La administración neonatal de EV produce un incremento significativo del contenido de DA en SN-VTA y CE de ratas hembras adultas. Sin embargo, el contenido de NA solo aumento en el CE de las mismas ratas.
- 2.- La administración neonatal de EV aumenta la liberación de DA en NAcc inducida por un estímulo depolarizante en ratas hembras adultas.
- 3.- La administración neonatal de EV disminuye la liberación de DA en NAcc inducida por la administración intra-NAcc y sistémica de anfetamina en ratas hembras adultas.
- 4.- La administración sistémica de anfetamina produce un aumento de la actividad locomotora en ratas hembras control. Sin embargo, ratas hembras tratadas con EV al PND1 producen una menor actividad locomotora inducida por anfetamina.
- 5.- La administración neonatal de EV disminuye los niveles séricos de progesterona, sin afectar los niveles séricos de estradiol en la vida adulta de la rata.

- 6.- La administración neonatal de EV produjo una disminución significativa del peso de parámetros morfométricos, como ovario, útero e hipófisis en la vida adulta de la rata hembra.
- 7.- La administración neonatal de EV produce un incremento significativo del contenido de DA en SN-VTA de ratas machos adultos. Sin embargo, no afecta la liberación de DA ni la actividad locomotora inducida por anfetamina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp* 1991; 156:38-50; discussion 50-35
2. Davies MJ, Norman RJ. Programming and reproductive functioning. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13:386-392
3. Katsuda S, Yoshida M, Watanabe G, Taya K, Maekawa A. Irreversible effects of neonatal exposure to p-tert-octylphenol on the reproductive tract in female rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000;165:217-226
4. Yoshida M, Takenaka A, Katsuda S, Kurokawa Y, Maekawa A. Neonatal exposure to p-tert-octylphenol causes abnormal expression of estrogen receptor alpha and subsequent alteration of cell proliferating activity in the developing Donryu rat uterus. *Toxicol Pathol* 2002;30:357-364
5. Sotomayor-Zarate R, Dorfman M, Paredes A, Lara HE. Neonatal exposure to estradiol valerate programs ovarian sympathetic innervation and follicular development in the adult rat. *Biol Reprod* 2008;78:673-680
6. Sotomayor-Zarate R, Tiszavari M, Cruz G, Lara HE. 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;96:1490-1496
7. Pfau JG, Damsma G, Nomikos GG, et al. Sexual behavior enhances central dopamine transmission in the male rat. *Brain Res* 1990;530:345-348
8. Di Chiara G, Imperato A. 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;85:5274-5278
9. Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* 2010;35:217-238
10. Wise RA. Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. *Neuron* 2002;36:229-240
11. Kalivas PW, Volkow ND. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry* 2005;162:1403-1413
12. Bassareo V, Di Chiara G. 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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1997;17:851-861
13. McEwen B. Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog Horm Res* 2002;57:357-384
14. Belcher SM, Zsarnovszky A. Estrogenic actions in the brain: estrogen, phytoestrogens, and rapid intracellular signaling mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299:408-414
15. Becker JB. Sexual differentiation of motivation: a novel mechanism? *Horm Behav* 2009;55:646-654
16. Becker JB, Hu M. Sex differences in drug abuse. *Front Neuroendocrinol* 2008;29:36-47

17. Johnson ML, Ho CC, Day AE, et al. Oestrogen receptors enhance dopamine neurone survival in rat midbrain. *J Neuroendocrinol* 2010;22:226-237
18. Silverman JL, Koenig JI. Evidence for the involvement of ERbeta and RGS9-2 in 17-beta estradiol enhancement of amphetamine-induced place preference behavior. *Horm Behav* 2007;52:146-155
19. Sotomayor-Zarate R, Quiroz G, Araya KA, et al. 4-Methylthioamphetamine increases dopamine in the rat striatum and has rewarding effects in vivo. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2012;111:371-379
20. Segarra AC, Agosto-Rivera JL, Febo M, et al. Estradiol: a key biological substrate mediating the response to cocaine in female rats. *Horm Behav* 2010;58:33-43
21. Chavez C, Hollaus M, Scarr E, et al. The effect of estrogen on dopamine and serotonin receptor and transporter levels in the brain: an autoradiography study. *Brain Res* 2010;1321:51-59
22. Yanagihara N, Liu M, Toyohira Y, et al. Stimulation of catecholamine synthesis through unique estrogen receptors in the bovine adrenomedullary plasma membrane by 17beta-estradiol. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;339:548-553
23. Yanagihara N, Toyohira Y, Ueno S, et al. Stimulation of catecholamine synthesis by environmental estrogenic pollutants. *Endocrinology* 2005;146:265-272
24. Navarro VM, Sanchez-Garrido MA, Castellano JM, et al. Persistent impairment of hypothalamic KiSS-1 system after exposures to estrogenic compounds at critical periods of brain sex differentiation. *Endocrinology* 2009;150:2359-2367
25. Khurana S, Ranmal S, Ben-Jonathan N. Exposure of newborn male and female rats to environmental estrogens: delayed and sustained hyperprolactinemia and alterations in estrogen receptor expression. *Endocrinology* 2000;141:4512-4517
26. Centola GM. Surface features of exfoliated vaginal epithelial cells during the oestrous cycle of the rat examined by scanning electron microscopy. *J Anat* 1978;127:553-561
27. Torrens Y, Beaujouan JC, Besson MJ, Michelot R, Glowinski J. Inhibitory effects of GABA, L-glutamic acid and nicotine on the potassium-evoked release of substance P in substantia nigra slices of the rat. *Eur J Pharmacol* 1981;71:383-392
28. Abarca J, Bustos G. Differential regulation of glutamate, aspartate and gamma-aminobutyrate release by N-methyl-D-aspartate receptors in rat striatum after partial and extensive lesions to the nigro-striatal dopamine pathway. *Neurochem Int* 1999;35:19-33
29. Cruz G, Riquelme R, Espinosa P, et al. Neonatal Exposure to Estradiol Valerate Increases Dopamine Content in Nigrostriatal Pathway During Adulthood in the Rat. *Horm Metab Res* 2014;45: 1–6
30. Chi JD, Odontiadis J, Franklin M. Simultaneous determination of catecholamines in rat brain tissue by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999;731:361-367
31. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 5th ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press.; 2005
32. Hall JE. "Guyton y Hall Tratado de Fisiología Médica" Decimosegunda Edición ed. Barcelona: Elsevier España, S.L.; 2011
33. Ganong WF. *Fisiología Médica*. Vigésima Edición ed. México, D.F.: Editorial El Manual Moderno, México; 2006

34. Cruz G, Barra R, Gonzalez D, Sotomayor-Zarate R, Lara HE. Temporal window in which exposure to estradiol permanently modifies ovarian function causing polycystic ovary morphology in rats. *Fertil Steril* 2012;98:1283-1290
35. Maharjan S, Serova L, Sabban EL. Transcriptional regulation of tyrosine hydroxylase by estrogen: opposite effects with estrogen receptors alpha and beta and interactions with cyclic AMP. *J Neurochem* 2005;93:1502-1514
36. Schwarz JM, Nugent BM, McCarthy MM. Developmental and hormone-induced epigenetic changes to estrogen and progesterone receptor genes in brain are dynamic across the life span. *Endocrinology* 2010;151:4871-4881
37. Maharjan S, Serova LI, Sabban EL. Membrane-initiated estradiol signaling increases tyrosine hydroxylase promoter activity with ER alpha in PC12 cells. *J Neurochem* 2010;112:42-55
38. D. Sibley IHMK, P. Skolnick. Chap. 7 Dopaminergic neurotransmission. In: D. Sibley IHMK, P. Skolnick ed, *handbook of contemporary neuropharmacology*. 1st ed. New jersey: John Wiley & sons; 2007:221-256
39. Sitte HH, Freissmuth M. The reverse operation of Na(+)/Cl(-)-coupled neurotransmitter transporters--why amphetamines take two to tango. *J Neurochem* 2009;112:340-355
40. Rothman RB, Baumann MH. Monoamine transporters and psychostimulant drugs. *Eur J Pharmacol* 2003;479:23-40
41. Tian YH, Baek JH, Lee SY, Jang CG. Prenatal and postnatal exposure to bisphenol a induces anxiolytic behaviors and cognitive deficits in mice. *Synapse* 2010;64:432-439
42. Ishido M, Yonemoto J, Morita M. Mesencephalic neurodegeneration in the orally administered bisphenol A-caused hyperactive rats. *Toxicol Lett* 2007;173:66-72
43. Sprague Dawley Rats When Ordering Specify SAS SD. Research Application General Multipurpose Model, Safety and Efficacy Testing Nutrition, Diet-Induced Obesity, Oncology.