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

LA ADMINISTRACIÓN NEONATAL DE HORMONAS SEXUALES AFECTA EL DESARROLLO DE CONDUCTAS TIPO ADICTIVAS INDUCIDAS POR METILFENIDATO EN RATAS ADULTAS.

Tesis para optar al grado Académico de

Licenciada en Ciencias mención Biología

Tatiana Dib Schwellinger

Director de Tesis: Dr. Ramón Sotomayor-Zárate

Co-Director de Tesis: Dr. Jonathan Martínez Pinto

2017

AGRADECIMIENTOS

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. Además, parte de los resultados de esta tesis fueron presentados en el Congreso XXXVIII de la Sociedad de Farmacología de Chile, Chiloé, Chile.

DEDICATORIA

Quiero agradecer a mi familia, que me ha apoyado durante toda mi vida y que además estuvieron en los buenos y en los malos momentos. A mi pareja, Valentín, por ser un pilar fundamental en mi vida y por su apoyo incondicional. A mis amigos, que con sus conversaciones y consejos me ayudaron a seguir adelante. A mis compañeros y amigos del laboratorio, que con sus risas y buenos ratos hicieron que este proceso fuera muy agradable y entretenido. A mi co-director Jonathan, por enseñarme muchas técnicas en el laboratorio que ayudaron a perfeccionarme como futura científica y a mi profesor, Ramón Sotomayor-Zárate, que con su ánimo y entusiasmo logró guiarme por este tiempo difícil en el proceso de la tesis, además de darme un dato excelente para mi futuro doctorado en Alemania.

Y por último a la banda *Depeche Mode* que me acompañó con su música durante la escritura de esta tesis.

INDICE

1) RESUMEN 6

2) INTRODUCCIÓN 8

2.1) Concepto de Reprogramación por Hormonas Sexuales: 8

2.2) Circuito de la Recompensa: 9

2.3) Hormonas Sexuales y Efectos Cerebrales: 11

2.4) Modelos Animales para el Estudio de Drogas de Abuso: 13

2.5) Efectos Conductuales de Drogas de Abuso y su Regulación por Hormonas Sexuales: 16

2.6) Metilfenidato: 17

2.7) Planteamiento del problema: 18

3) HIPÓTESIS 19

4) OBJETIVOS 20

4.1) Objetivo General: 20

4.2) Objetivos Específicos: 20

5) MATERIALES Y MÉTODOS 21

5.1) Animales: 21

5.2) Reactivos: 21

5.3) Administración de EV, TP y Aceite de Sésamo: 21

5.4) Registro de la Etapa del Ciclo Estral: 22

5.5) Paradigmas para medir conductas tipo adictivas: 23

5.6) Western Blot para Determinar la Expresión de DAT: 26

5.7) Cálculos y Análisis Estadístico: 28

6) RESULTADOS 29

6.1) Caracterización del Modelo de Estrogenización y Androgenización Neonatal: 29

6.2) Efectos de la Reprogramación Neonatal con Hormonas Sexuales sobre la Actividad Locomotora inducida por Metilfenidato en Ratas Hembras Adultas. 37

6.3) Efectos de la Reprogramación Neonatal con Hormonas Sexuales sobre la Actividad Locomotora inducida por Metilfenidato en Ratas Machos Adultas. 39

6.4) Diferencias Sexuales a los Efectos Recompensantes de Metilfenidato en Ratas Hembras y Machos Adultas. 41

6.5) Efectos de la Reprogramación Neonatal con Hormonas Sexuales sobre la Expresión de DAT en NAcc y CE en Ratas Hembras Adultas. 42

6.6) Efectos de la Reprogramación Neonatal con Hormonas Sexuales sobre la Expresión de DAT en NAcc y CE en Ratas Machos Adultas. 44

6.7) Efectos de la Reprogramación Neonatal con Hormonas Sexuales sobre la Preferencia de Lugar Condicionada a Metilfenidato en Ratas Hembras Adultas. 46

6.8) Efectos de la Reprogramación Neonatal con Hormonas Sexuales sobre la Preferencia de Lugar Condicionada a Metilfenidato en Ratas Machos Adultas. 49

7) DISCUSIÓN 52

7.1) Efectos de la Reprogramación Neonatal con Hormonas Sexuales sobre Tejidos Sensibles 52

7.2) Rol de la Reprogramación Neonatal con Hormonas Sexuales sobre los Efectos Recompensantes de Metilfenidato 53

7.3) Rol de la Reprogramación Neonatal con Hormonas Sexuales sobre la Expresión de DAT en NAcc y CE de ratas adultas 58

7.4) Proyecciones Futuras 59

8) CONCLUSIONES 60

9) BIBLIOGRAFÍA 61

1) 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, los cuales pueden producir efectos deletéreos a largo plazo. En estudios preliminares obtenidos en nuestro laboratorio, se ha demostrado que en ratas hembras expuestas durante las primeras horas de vida postnatal a estradiol valerato (EV) se produce una menor liberación de dopamina (DA) inducida por anfetamina en Núcleo Accumbens (NAcc). Además, esta menor liberación de DA en NAcc se asoció con un menor condicionamiento a esta misma droga de abuso. Por otro lado, estudios recientes demostraron que la exposición neonatal a testosterona propionato (TP), también aumenta el contenido de DA en los circuitos cerebrales relacionados con la recompensa y la locomoción en ratas machos adultas. Considerando que a nivel farmacológico la anfetamina aumenta la liberación de DA, revirtiendo la actividad del transportador de DA (DAT), se decidió estudiar, como objetivo principal en esta tesis, los efectos de la administración neonatal a EV y TP sobre las conductas tipo adictivas inducidas por metilfenidato en ratas adultas. La decisión de cambiar la droga de estudio se basa en que metilfenidato, a diferencia de anfetamina, es un bloqueador de DAT que aumenta los niveles extracelulares de DA por inhibición de la recaptación, mientras que para anfetamina el aumento de DA es dependiente de la reversión en el flujo de DA a través de DAT.

Los estudios conductuales obtenidos en esta tesis demostraron que en ratas hembras tratadas con TP, la actividad locomotora inducida por metilfenidato es significativamente menor a la observada en ratas hembras control y EV. Utilizando el paradigma de preferencia de lugar condicionado a metilfenidato, se observó que todas las ratas hembras (incluyendo a las con tratamiento hormonal) se condicionan a los efectos recompensantes de la droga. Sin embargo, en machos no se observaron cambios estadísticamente significativos en estas pruebas conductuales. En los estudios de inmunoblots, para determinar los niveles de expresión de DAT en NAcc, se observó una disminución de los niveles de esta proteína en ratas hembras tratadas con TP, correlacionándose con la disminución en la actividad locomotora observada en las pruebas conductuales.

Los resultados de esta tesis nos demuestran que la reprogramación neonatal con hormonas sexuales afecta proteínas clave para la neurotransmisión dopaminérgica.

2) INTRODUCCIÓN

2.1) Concepto de Reprogramación por Hormonas Sexuales:

El concepto de reprogramación ha sido 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 neonatal (postnatal temprano), el cual provoca cambios funcionales a largo plazo [1]. Lo importante de esta definición es que, durante el desarrollo, existen períodos críticos de vulnerabilidad, que son ventanas de sensibilidad, para condiciones adversas que pueden redireccionar la fisiología normal de diferentes órganos en el organismo.

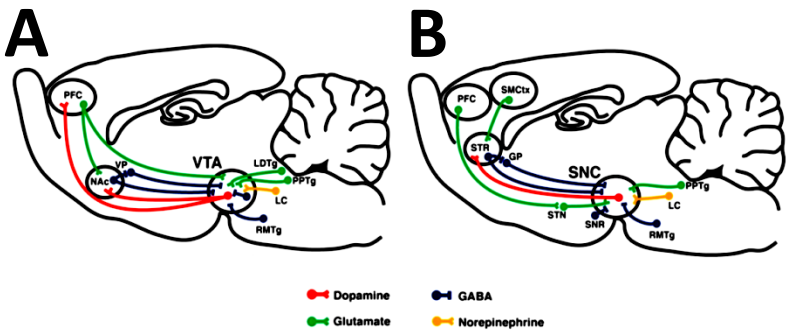
Se ha observado, que a nivel de sistema reproductivo, la exposición neonatal a compuestos con actividad estrogénica produce alteraciones en el funcionamiento de las gónadas, afectando la fertilidad en humanos y animales [2]. En la década de los 60 se demostró que la exposición neonatal a testosterona (T) en el día postnatal (PND) 5 produjo, en ratas hembra adultas, una condición anovulatoria acompañada de la formación de quistes ováricos [3]. En Chile, el grupo del Dr. Hernán E. Lara demostró en el año 2011 que la administración neonatal de una dosis única de hormonas sexuales, como estradiol valerato (EV) o testosterona propionato (TP), produce en ratas hembras adultas alteraciones reproductivas y neuroquímicas en el contenido de neurotransmisores en el hipotálamo ventromedial [4]. Recientemente, nuestro laboratorio ha demostrado que la administración neonatal de EV y de TP aumentan el contenido de catecolaminas en el circuito mesocorticolímbico a través de un aumento

de la expresión de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) en Sustancia Nigra (SN) y Área tegmental ventral (VTA) [5,6].

2.2) Circuito de la Recompensa:

El circuito de la recompensa es un circuito neuro-anatómico presente en el cerebro de animales vertebrados desde teleósteos hasta primates superiores [7]. Este circuito es activado por estímulos recompensantes que se pueden producir en el diario vivir, tales como el sexo, la comida y la ingesta de líquidos, los cuales generan una sensación de placer asociada a la liberación de un neurotransmisor catecolaminérgico llamado dopamina (DA), específicamente en un área límbica conocida como Núcleo Accumbens (NAcc) o estriado ventral [8,9]. La DA es un neurotransmisor sintetizado por neuronas localizadas en el VTA (Sistema Mesocorticolímbico), en el Núcleo Arcuato del Hipotálamo (Sistema Tuberoinfundibular) y en la SN *pars compacta* (Sistema Nigroestriatal) (Figura 1).

Figura 1: Sistema Mesocorticolímbico y Nigroestriatal

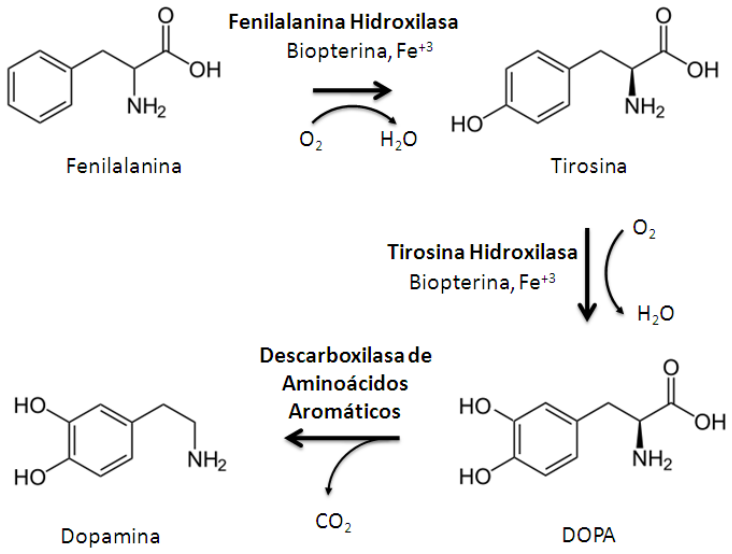


Vías dopaminérgicas Mesocorticolímbico (A) y Nigroestriatal (B). Abreviaturas:* PFC,** *corteza prefrontal;* **NAc,** *Núcleo Accumbens;* **VP,** *palido ventral;* **VTA,** *área tegmental ventral;* **LDTg,** *tegumento laterodorsal;* **PPTg,** *núcleo pedunculopontino tegmental;* **LC,** *locus coeruleus;* **RMTg,** *núcleo rostromedial tegmental;* **SMCtx,** *corteza somatosensorial;* **STR,** *estriado;* **GP,** *globo palido;* **STN,** *núcleo subtalámico;* **SNC,** *sustancia nigra compacta;* **SNR,** *sustancia nigra reticular.* ***Figura tomada y adaptada de referencia *[10]*

Estas neuronas dopaminérgicas pueden sintetizar DA mediante diversas reacciones enzimáticas, en donde la enzima limitante en la síntesis de DA es la TH. Esta enzima hidroxila al aminoácido Tirosina a L-DOPA, y ésta última es descarboxilada a DA en neuronas catecolaminérgicas (Figura 2). Neuroquímicamente, las neuronas dopaminérgicas involucradas en conductas motivadas y placenteras tienen sus somas a nivel mesencefálico, específicamente en VTA, proyectando axones hacia NAcc y a Corteza Prefrontal [11]. Este circuito neuronal es conocido como el Circuito de la Recompensa o Mesocorticolímbico, que es fundamental para la sobrevida de las especies [12]. Como se mencionó anteriormente la actividad neuronal en este circuito es modulada por recompensantes naturales, como el sexo [8] y las comidas palatables [9], así como por drogas de abuso [13]. El grupo del Dr. Gaetano Di Chiara (Universidad de Cagliari, Italia) ha demostrado a través del uso de la técnica de microdiálisis cerebral *in vivo*, que prácticamente todas las drogas de abuso producen un aumento en la liberación de DA en el circuito de la recompensa y en el Cuerpo Estriado [11]. Recientemente, la investigación en el campo de las drogas de abuso se ha interesado en la búsqueda de factores de vulnerabilidad que den cuenta del tránsito del uso recreacional en el consumo de una droga a la utilización abusiva e incluso adictiva. Por este motivo, nuestro laboratorio se ha interesado durante el último tiempo en estudiar los efectos a largo plazo de la exposición a hormonas sexuales durante períodos tempranos del desarrollo en la regulación neuroquímica y en la generación de conductas adictivas inducidas por drogas de abuso. Por lo que, en esta tesis se decidió

estudiar los efectos de la administración neonatal de hormonas sexuales sobre la respuesta conductual a metilfenidato en ratas adultas de ambos sexos.

Figura 2: Síntesis de la Dopamina



Síntesis de la Dopamina. *La tirosina hidroxilasa es la enzima limitante de la reacción química.*

2.3) Hormonas Sexuales y Efectos Cerebrales:

Las hormonas sexuales se caracterizan por ser hormonas lipofílicas, capaces de cruzar las membranas biológicas, y unirse a proteínas receptoras a nivel citoplasmático, que en conjunto se movilizan al núcleo para afectar la transcripción de genes blancos [14]. Por otro lado, las hormonas sexuales tienen la capacidad de distribuirse a diversos tejidos, entre los cuales está el cerebro [14]. A nivel cerebral, los receptores de estrógenos y andrógenos están presentes en diversas áreas cerebrales [15], incluyendo áreas dopaminérgicas como el circuito de la recompensa [16]. En correlación con lo anteriormente mencionado, se ha demostrado que en ratas ovariectomizadas (OVX),

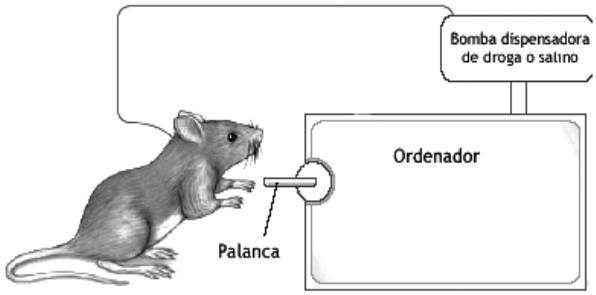
en las cuales los niveles de estrógenos plasmáticos prácticamente son despreciables, se ha observado una disminución significativa en el número de neuronas TH positivas en SN y VTA [17]. Por otro lado, el reemplazo con agentes estrogénicos en las ratas OVX restablece los niveles normales de expresión de la TH en las mismas áreas cerebrales [17]. Adicionalmente, también se ha observado que los estrógenos son capaces de modular otras importantes proteínas que regulan el sistema dopaminérgico. Por ejemplo, se ha observado que en ratas OVX se produce una reducción significativa en los niveles de expresión de DAT en NAcc [18], mientras que el reemplazo con agentes estrogénicos restituye los niveles normales de expresión de DAT [18].

Interesantemente, en nuestro laboratorio hemos observado que la administración neonatal de EV y TP aumenta la expresión del mRNA y proteína TH en SN-VTA de ratas adultas, respecto a ratas control y tratadas durante las primeras horas de vida postnatal con DHT [6]. Estos resultados nos han entregado valiosa evidencia que los efectos de las hormonas sexuales sobre la regulación de TH serían a través de un mecanismo estrogénico directo (inducido por EV) o indirecto (inducido por TP), ya que la administración neonatal de DHT (andrógeno no aromatizable) no afecta la expresión de TH. A nivel neuroquímico, los cambios en la expresión de la TH a nivel mesencefálico por la reprogramación neonatal con hormonas sexuales, se traduce funcionalmente en un mayor contenido de neurotransmisores monoaminérgicos, como DA, noradrenalina (NA) y serotonina (5-HT) en el Hipotálamo Ventromedial-Núcleo Arcuato [4] y en SN-VTA [5,6].

2.4) Modelos Animales para el Estudio de Drogas de Abuso:

Un importante paradigma de esta tesis es la conducta animal mediada por drogas de abuso las cuales representan la conducta adictiva observada en humanos. Estos modelos animales permiten evaluar conductas tipo adictivas a través de la administración aguda o crónica de una droga de abuso. En este sentido, el modelo de autoadministración de drogas, es el modelo más cercano a la conducta adictiva observada en humanos, permitiendo evaluar todas las etapas del proceso adictivo, como la adquisición, la mantención y las recaídas al consumo de las drogas de abuso [19] (Figura 3). En la literatura se ha demostrado que la conducta adictiva se caracteriza por un aumento en la liberación de dopamina en NAcc, como se mencionó previamente, por lo que la adicción a drogas está relacionada a este aumento en la dopamina extracelular.

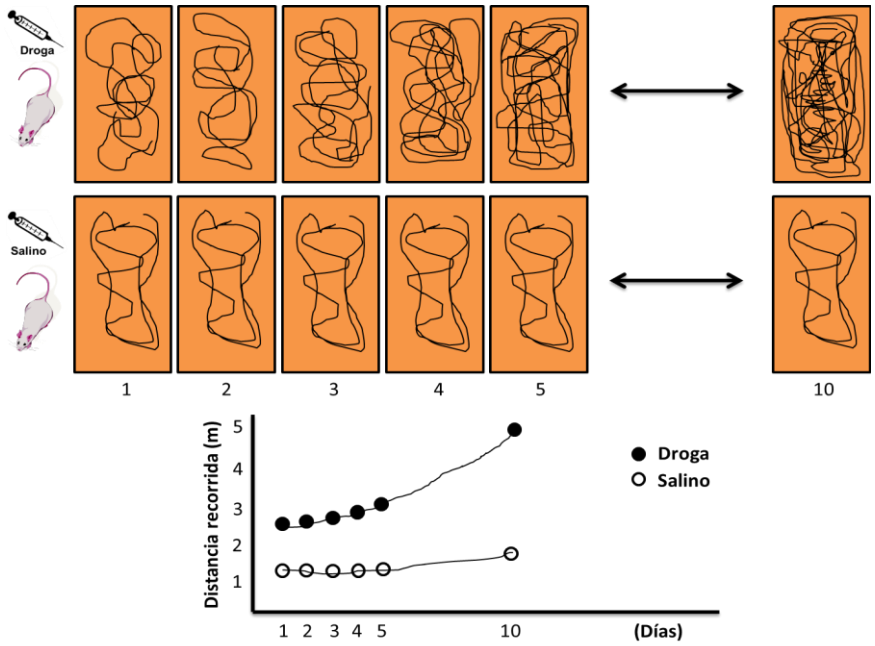
Figura 3: Autoadministración de Drogas de Abuso



Esquema del modelo de autoadministración de drogas de abuso. *El esquema nos muestra la acción operante que realiza el animal al apretar una palanca que le entrega una dosis intravenosa de la droga. El contexto ambiental del modelo de autoadministración se lleva a cabo en una caja con claves ambientales que favorecen el aprendizaje del animal. Por ejemplo, una luz ambiental que se prende cuando el animal aprieta la palanca que le entrega la droga.* ***Figura tomada y adaptada de referencias [60] y [61].***

Otro modelo animal de conductas tipo adictivas, corresponde a la sensibilización locomotora en donde se realiza una administración repetida de la droga de abuso por un tiempo definido, observándose que la respuesta locomotora aumenta progresivamente [20]. El desarrollo de la sensibilización locomotora puede ser separado en la fase de iniciación inducida por cambios neurales a nivel de VTA y una fase de expresión a largo plazo mediado por los eventos neurales iniciales asociados a NAcc [21]. Este modelo experimental permite predecir el potencial adictivo de una droga de abuso cuando su efecto es acompañado por un aumento en la liberación de DA en NAcc [21].

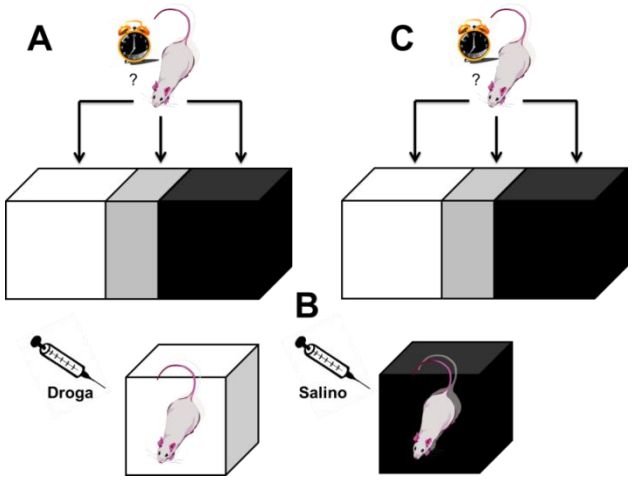
Figura 4: Sensibilización Locomotora



***Esquema del modelo de sensibilización locomotora**. El esquema muestra el aumento de la actividad locomotora mediada por la administración repetida de la droga de abuso (día 1 al 5). Este efecto es producido por una sensibilización del animal a los efectos de la droga, que después de un breve periodo de abstinencia produce una mayor expresión de la actividad locomotora (día 10). Como se observa la administración de salino no aumenta la actividad locomotora ni la expresión de la misma.*

Otro paradigma conductual utilizado en esta tesis fue la preferencia de lugar condicionado a la administración de la droga (CPP; *del inglés Conditioned Place Preference*). Este modelo se basa en el condicionamiento por contexto que generan las drogas de abuso asociado a su efecto recompensante [22]. Este paradigma se realiza en una caja de CPP en la cual los animales pueden explorar tres compartimientos diferentes entre sí respecto al tamaño, colores y texturas. En una primera etapa los animales exploran libremente los compartimientos del equipo, en donde el experimentador establece la mayor preferencia por un compartimiento por medio del mayor tiempo que el animal pasa en este espacio en un tiempo determinado (Figura 5). En nuestro laboratorio se ha demostrado que los animales tienen una mayor preferencia por el compartimento negro.

Figura 5: Condicionamiento de Preferencia de Lugar



***Esquema del modelo de preferencia de lugar condicionado**. A) Pretest: medición del tiempo de permanencia en las tres cámaras. B) Condicionamiento: administración no contingente de la droga en la cámara de menor preferencia y de salino en la de mayor preferencia. C) Test: medición del tiempo de permanencia en las tres cámaras.*

Por otro lado, se establece el espacio de menor preferencia como el contexto en el cual el animal recibirá la administración de la droga de abuso (en este caso, metilfenidato) durante la fase de condicionamiento. En una etapa final de la prueba se le permite al animal nuevamente explorar los tres compartimientos, observándose si la preferencia inicial por los compartimientos cambia con la administración de la droga de abuso [23].

2.5) Efectos Conductuales de Drogas de Abuso y su Regulación por Hormonas Sexuales:

La relación entre hormonas sexuales y conductas tipo adictivas, ha sido establecida principalmente en animales gonadectomizados y sujetos a reemplazo hormonal. Así, por ejemplo, se ha observado que en ratas OVX no se produce la preferencia de lugar condicionado (CPP) a anfetamina [24]. Sin embargo al reemplazar la deficiencia hormonal con estradiol, se reestablece la conducta de CPP [24]. A nivel de actividad locomotora, la administración de estradiol benzoato en ratas OVX incrementa la actividad locomotora y sensibilización conductual inducida por cocaína, respecto a ratas OVX tratadas con vehículo [25].

Respecto a diferencias sexuales observadas en la respuesta a drogas de abuso (como la cocaína, el metilfenidato y la anfetamina), se ha demostrado que las ratas hembras son más propensas en adquirir la conducta de autoadministración a cocaína y heroína (bajo programas fijos y progresivos de administración) al comparar con ratas machos [26]. Además, la conducta de autoadministración a cocaína permanece aumentada en ratas hembras, por más tiempo durante períodos de abstinencia prolongado, que la

observada en ratas machos [27]. De hecho, al remover los ovarios se ha observado una disminución en la conducta de autoadministración a cocaína [27]. Por otro lado, al administrar tamoxifeno (un antagonista de receptores de estrógenos) en ratas hembras intactas se produce una disminución de la conducta de autoadministración a cocaína al comparar con ratas hembras control [28]. Por lo que se puede sugerir, que los estrógenos tienen un rol fundamental en el comportamiento tipo adictivo en ratas hembras, como lo confirma la ovariectomización y la administración de un antagonista de receptores de estrógenos.

2.6) Metilfenidato:

En esta tesis se utilizó como droga de abuso al metilfenidato para inducir las conductas tipo adictivas en ratas control y tratadas con hormonas sexuales, conocido comercialmente como Ritalin® y utilizado terapéuticamente para tratar el trastorno de déficit atencional con hiperactividad [29]. A nivel de mecanismo de acción el metilfenidato y la cocaína actúan como bloqueadores del DAT, uniéndose a un sitio externo que evita que la DA sea captada por DAT en la neurona presináptica [30]. Produciendo como efecto neto, un aumento en los niveles extracelulares de dopamina. Recientemente se ha demostrado, por los estudios de Cummins y cols., que el metilfenidato reduce la expresión de DAT en áreas cerebrales relacionadas con el circuito de la recompensa [31]. Esto sugiere un efecto menor del metilfenidato en un futuro, debido a la baja presencia del blanco farmacológico de esta droga, como lo es el

DAT, lo que implica una menor cantidad de dopamina en el espacio extracelular inducido por metilfenidato.

2.7) Planteamiento del problema:

La racional del problema de esta tesis se basa en resultados no publicados de nuestro laboratorio en que se observó que ratas hembras EV tienen una menor liberación de DA inducida por anfetamina a nivel de NAcc al PND 60. Como se había planteado anteriormente, ratas tratadas con EV o TP presentan un aumento en la liberación de dopamina en NAcc, por lo que resulta interesante que cuando se inyectan las ratas con anfetamina, este efecto se revierte (disminuye la liberación de dopamina en comparación a un control). El porcentaje de estos animales que hacen preferencia de lugar condicionado a anfetamina es mucho menor que el observado en ratas hembras control. Se puede deducir que esto se debe a la disminución en la liberación de dopamina en NAcc. Sin embargo, no sabemos si estos efectos neuroquímicos y conductuales se deben a un cambio de la afinidad de DAT por la anfetamina o por una reducción en los niveles de expresión de DAT. Por este motivo, se decidió estudiar los efectos del metilfenidato sobre la conducta de actividad locomotora y de CPP en ratas adultas tratadas durante las primeras horas de vida postnatal a hormonas sexuales. Paralelamente, se evaluaron los niveles de expresión de DAT medidos a través de Western Blot en NAcc y en CE en las ratas antes mencionadas.

3) HIPÓTESIS

La hipótesis de esta tesis se basa en datos de la literatura [18], como por ejemplo que las ratas OVX no presentan conductas tipo adictivas y que cuando se administran estrógenos, estas conductas vuelven a aparecer. Otro ejemplo es que las hembras son más sensibles a las drogas de abuso, posiblemente debido a la presencia de estrógenos en ellas. Y también se basa en datos no publicados de nuestro laboratorio que demuestran que sólo en ratas hembras adultas tratadas durante las primeras horas de vida postnatal con EV se observa una menor liberación de DA en NAcc inducida por anfetamina (a pesar de que cuando las ratas solamente se tratan con EV o TP, éstas presentan un aumento en la liberación de dopamina en NAcc). Además, otros datos no publicados de nuestro laboratorio demuestran que las ratas hembras tratadas con EV y TP no presentan conductas tipo adictivas inducidas por anfetamina, posiblemente debido a la disminución en la liberación de dopamina inducida por esta droga. Por lo tanto, considerando estos antecedentes la hipótesis de esta tesis fue:

"La administración neonatal de EV y de TP disminuye el desarrollo de conductas tipo adictivas inducidas por metilfenidato en ratas hembras adultas, a través de una reducción de los niveles de expresión de DAT en NAcc".

La disminución de la expresión de DAT podría implicar en un menor efecto del metilfenidato, debido a la baja presencia de su blanco farmacológico.

4) OBJETIVOS

4.1) Objetivo General:

Estudiar los efectos de la administración neonatal de EV y TP sobre el desarrollo de conductas tipo adictivas inducidas por un fármaco (metilfenidato) en ratas adultas y relacionar las conductas tipo adictivas con los niveles de expresión de DAT en NAcc de los mismos animales.

4.2) Objetivos Específicos:

- Estudiar los efectos de la administración neonatal de EV, TP y aceite de sésamo al PND 1 en ratas Sprague-Dawley de ambos sexos, sobre la actividad locomotora inducida por metilfenidato al PND 60.
- Determinar los niveles de expresión de DAT en NAcc y CE de ratas adultas expuestas durante las primeras horas de vida postnatal a EV, TP y aceite de sésamo. Esta determinación se realizará en ratas control y tratadas de ambos sexos que al PND 60 recibieron 1 dosis de metilfenidato.
- Estudiar los efectos de la administración neonatal de EV, TP y aceite de sésamo al PND 1 en ratas Sprague-Dawley de ambos sexos, sobre la conducta de CPP a metilfenidato al PND 60.

5) MATERIALES Y MÉTODOS

5.1) Animales:

Se utilizaron crías de ratas Sprague-Dawley de ambos sexos recién nacidas. Todos los animales fueron alojados en la "Sala de Mantención de Animales de Experimentación del Instituto de Fisiología", con temperatura controlada (22 ± 2°C) bajo ciclos día-noche (12:12), encendiendo las luces a las 08:00 am con temporizador automático. Los animales fueron destetados al PND 21, y desde esta fecha hasta el día PND 60 fueron mantenidos con comida (Prolab® RMH 3000, LABDIET) y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales planteados en esta tesis han sido 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 esta tesis, se hicieron todos los esfuerzos para reducir al mínimo el número de animales utilizados y su sufrimiento.

5.2) Reactivos:

Estradiol Valerato (EV), Testosterona Propionato (TP) y Aceite de Sésamo fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, Missouri, USA). El metilfenidato ha sido donado por CFR Corporación Farmacéutica Recalcine al Dr. Miguel Reyes-Parada (Universidad de Santiago de Chile).

5.3) Administración de EV, TP y Aceite de Sésamo:

Diferentes camadas de ratas de ambos sexos fueron inyectadas con EV, TP y aceite de sésamo. Cada animal del grupo EV se inyectó durante las primeras 12 horas de vida

postnatal con 0,1 mg de EV disuelto en 50 µL de aceite de sésamo, mientras que las ratas del grupo TP fueron inyectadas con 1,0 mg de TP disuelto en 50 µL de aceite de sésamo. Las camadas asignadas al grupo control fueron inyectadas con 50 µL de aceite de sésamo (vehículo de disolución de las hormonas sexuales). Todas las crías fueron mantenidas con lactancia materna hasta el PND 21, para luego ser destetadas y alojadas por sexo y tratamiento en jaulas de tamaño estándar (16 cm de alto, 26 cm de ancho y 47 cm de largo (máximo 5 animales por jaula) de a 4 a 5 animales por caja. Para las ratas hembras de los grupos control y EV, se registró la etapa del ciclo estral desde el PND 40 hasta el PND 60 para corroborar la etapa del ciclo estral el día de los experimentos conductuales y celulares. También se determinó la fecha de apertura vaginal, como una medida de inicio de la pubertad.

5.4) Registro de la Etapa del Ciclo Estral:

El registro diario del ciclo estral fue realizado a partir de la fecha de apertura vaginal de las ratas hembras y basado en características citológicas que adopta el epitelio vaginal, por efecto de los niveles circulantes de hormonas sexuales esteroidales y que caracterizan las etapas periovulatorias [32]. Brevemente, la etapa proestro dura entre 12 a 24 horas y citológicamente se caracteriza por la presencia de células epiteliales nucleadas, redondeadas y sólo algunas escamosas de forma irregular. La etapa 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. La etapa de metaestro dura 12 a 24 horas y se aprecian leucocitos y células escamosas de forma

irregular. Finalmente, la etapa de diestro dura aproximadamente 48 horas y se observa una alta presencia de leucocitos en el frotis.

5.5) Paradigmas para medir conductas tipo adictivas:

5.5.1) Preferencia de lugar condicionado (CPP) a metilfenidato

5.5.1.1) Equipo de CPP: El equipo de CPP utilizado en esta tesis es un equipo de tres compartimientos (blanco, negro y gris), conectados entre sí por puertas móviles de acción manual. Los compartimientos blanco y negro son de igual tamaño y sus dimensiones son 21 cm de ancho, 21 cm de largo y 28 cm de alto. El compartimiento del medio es de menor tamaño y de color gris. Este pasillo conecta a los otros dos compartimientos de mayor tamaño por puertas móviles tipo guillotina. El compartimiento blanco tiene paredes y suelo liso, iluminado con luz blanca tenue que genera una intensidad lumínica de 30 lux en el centro del compartimiento, aproximadamente. El compartimiento gris consta de paredes y suelo liso sin iluminación, mientras que el compartimiento negro presenta paredes lisas, el suelo con una malla con orificios pequeños y no tiene iluminación ambiental. Los animales fueron filmados por separado mediante cámaras inalámbricas (Modelo LX-C202, Lynx Security, China) fijas sobre cada equipo de CPP, que transmiten la videograbación a otra habitación. El tiempo de permanencia medido en segundos (s) de cada animal en cada compartimiento fue determinado manualmente utilizando cronómetros digitales

5.5.1.2) Protocolo de CPP: El protocolo de CPP con metilfenidato está dividido en tres fases, las cuales son: Pre-test, Condicionamiento y Test (ver Figura 5). En el Pre-test, los

animales fueron colocados en el equipo de CPP (en el compartimiento gris) con ambas puertas móviles abiertas. Los animales se aclimataron al equipo durante 3 min, para luego registrar por los siguientes 15 min el tiempo de permanencia en cada compartimiento. Estudios previos del Dr. Sotomayor-Zárate [33] han demostrado que las ratas en el equipo de CPP de tres cámaras presentan una preferencia natural por los compartimientos negro y gris durante la etapa del Pre-test. Por lo tanto, se usó el compartimiento blanco, como el compartimiento de menor preferencia y en el cual se administró el metilfenidato (5 mg/Kg i.p.). La administración de solución salina fisiológica (1 mL/Kg i.p.) fue realizada en el compartimiento negro que es el de mayor preferencia inicial. Cada compartimiento del equipo de CPP fue limpiado con una solución de etanol al 20 % $^{v}/_{v}$ después de cada ensayo. Durante los 5 días de condicionamiento los animales expuestos a metilfenidato recibieron una dosis diaria en el compartimiento blanco y fueron confinados a este espacio por 60 min. Los animales que recibieron las administraciones de solución salina fisiológica fueron confinados por el mismo tiempo en el compartimiento negro.

La etapa del test final fue realizada 24 horas después de finalizado el período de condicionamiento. Las ratas fueron puestas nuevamente en el compartimiento central del aparato con ambas puertas móviles abiertas. Los animales tuvieron un período de aclimatación al equipo de 3 min, para luego registrar por los siguientes 15 min el tiempo de permanencia en cada compartimiento. La diferencia de tiempo (ΔT) en segundos (s)

entre el test y el Pre-test se utilizó para determinar el grado de condicionamiento en los animales por sexo y tratamiento.

5.5.1.3) Criterio de condicionamiento: Para establecer si efectivamente un animal se condicionó a los efectos del metilfenidato se usó un criterio estadístico de condicionamiento previamente publicado [34] y validado en nuestro laboratorio en una tesis de pregrado anterior [35]. Brevemente este criterio establece que una rata condicionada a metilfenidato debe pasar el día del Test un tiempo mayor o igual al 60% del tiempo que pasó el día del Pre-Test en el compartimiento de menor preferencia. En este sentido, en el resto de esta tesis se abreviará este criterio como T60.

5.5.2) Actividad Locomotora

5.5.2.1) Equipo para medición de actividad locomotora: Cada animal fue colocado en una caja de medición de actividad locomotora (44 cm de largo, 22 cm de alto y 28 cm de ancho) durante 30 min para aclimatación al nuevo espacio. Una vez finalizado el período de aclimatación se administró una dosis de solución salina fisiológica (1 mL/Kg i.p) y se grabó la actividad locomotora producida por la inyección durante 60 min a través de cámaras inalámbricas (Modelo LX-C202, Lynx Security, China) fijas sobre cada caja que transmiten vía inalámbrica la grabación a un computador en otra habitación. Luego de los 60 min de grabación asociados a la inyección de solución salina fisiológica, se procedió a inyectar a las mismas ratas con una dosis de metilfenidato (5 mg/Kg i.p.) y se grabó nuevamente la actividad locomotora bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Este protocolo permitió que cada animal fuera su propio control,

minimizando el número de animales en cada experimento. Cada videograbación fue analizada utilizando el programa ANY-Maze™ (Stoelting Co., IL, USA) y se registró la distancia total recorrida (m).

5.6) Western Blot para Determinar la Expresión de DAT:

Los animales que fueron sometidos al protocolo de actividad locomotora fueron sacrificados por decapitación con guillotina para animales menores (modelo 51330, Stoelting™ Co., Wood Dale, IL, USA). El cerebro se extrajo y se microdisectaron el Hipotálamo, NAcc, Cuerpo Estriado (CE), Septum Lateral (SL), Substancia Nigra (SN) y Área Tegmental Ventral (VTA). Estos tejidos fueron pesados y almacenados a -80°C para su posterior análisis. En esta tesis se utilizó el NAcc para determinar la expresión de DAT, por ser el área cerebral relacionada con los efectos placenteros de las drogas de abuso. También se usó CE para determinar la expresión de DAT, por ser el área cerebral relacionada a la locomoción. En este sentido, el NAcc y el CE se homogenizaron utilizando un buffer RIPA, que consta de 50 mM de Tris HCl pH 8, 150 mM de NaCl, 1% de NP-40, 0,1% de SDS, 2 mM de EDTA pH 7,4 y 1,5 mM de PMSF, y con un cóctel inhibidor de proteasas (Cat# G6521, Promega™), para así extraer las proteínas a analizar, usando un sonicador (Microson Ultrasonic Cell Disruptor XL, Heat Systems). La concentración de proteínas totales de cada muestra se determinó utilizando el equipo Epoch (BioTek™ Instruments Inc., EEUU). Las proteínas obtenidas se resolvieron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida–SDS en condiciones denaturantes (4% gel concentrador, 8% gel resolutivo), cargando 30 µg por cada pocillo. Se electrotransfirió a

una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm de poro (Thermo™; Cat: 88018. Rockford, USA) durante 1,5 horas a 350 mA. Se bloquearon los sitios inespecíficos de las membranas incubándolas con leche descremada al 5% en T-TBS (Tween-20 al 0,1 % en solución de tris tamponada TBS – 20mM Tris, NaCl 137 mM) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, las membranas se incubaron con T-TBS durante toda la noche (O. N.) a 4°C, para así al día siguiente incubarlas con los anticuerpos. Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes: Anticuerpo primario anti-DAT desarrollado en cabra (1:1000, C-20 sc-1433, Santa Cruz Biotechnology) y anti-GAPDH desarrollado en conejo (1:10000; ab9485, Abcam). Luego de esto las membranas se lavaron 3 veces con T-TBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-cabra (para DAT) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) desarrollado en conejo (1: 20000, 305-035-047, Jackson InmunoResearch Laboratories) y anti-conejo (para GAPDH) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) desarrollado en burro (1:10000, 711-036-152, Jackson InmunoResearch Laboratories) en T-TBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de la incubación con el anticuerpo secundario las membranas se incubaron con solución de revelado para quimioluminiscencia aumentada -ECL- (EZ-ECL; Biological Industries. Cat: 20-500-500) y se obtuvieron imágenes de la membrana revelada utilizando el equipo EpiChemi^3 Darkroom, para posteriormente las imágenes ser analizadas utilizando el programa Image-J™ (NIH), cuantificando las bandas obtenidas en la membrana de nitrocelulosa, después de haber realizado el Western Blot.

5.7) Cálculos y Análisis Estadístico:

Los resultados fueron expresados como valor promedio ± error estándar medio (SEM). Las figuras que mostraron el curso temporal de actividad locomotora (medida como distancia recorrida en m) fueron analizadas por análisis de varianza de una cola (ANOVA) seguido por un post-test Newman-Keuls. Las diferencias entre los grupos control y tratamiento (EV, TP y control) fueron analizadas por test-t de Student no-pareado y la diferencia estadísticamente significativa se estableció cuando el valor de p fue menor que 0,05. Todos los análisis estadísticos han sido realizados con el programa GraphPad Prism v6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

6) RESULTADOS

6.1) Caracterización del Modelo de Estrogenización y Androgenización Neonatal:

6.1.1) Curvas de Peso y Parámetros de Función Reproductiva

A los animales de las series experimentales les fue registrado sus pesos corporales para establecer que todos los grupos de animales tuviesen curvas de crecimiento que mostrarán claramente una ganancia de peso. En este sentido, ratas hembras y machos control y de los grupos tratamiento (EV y TP) utilizadas en los experimentos conductuales de actividad locomotora (Figura 6) y de CPP (Figura 7) tuvieron una ganancia de peso similar a la observada previamente en otras series experimentales de nuestro laboratorio. Este experimento se realizó para comprobar que los animales crecieron de forma normal.

Figura 6

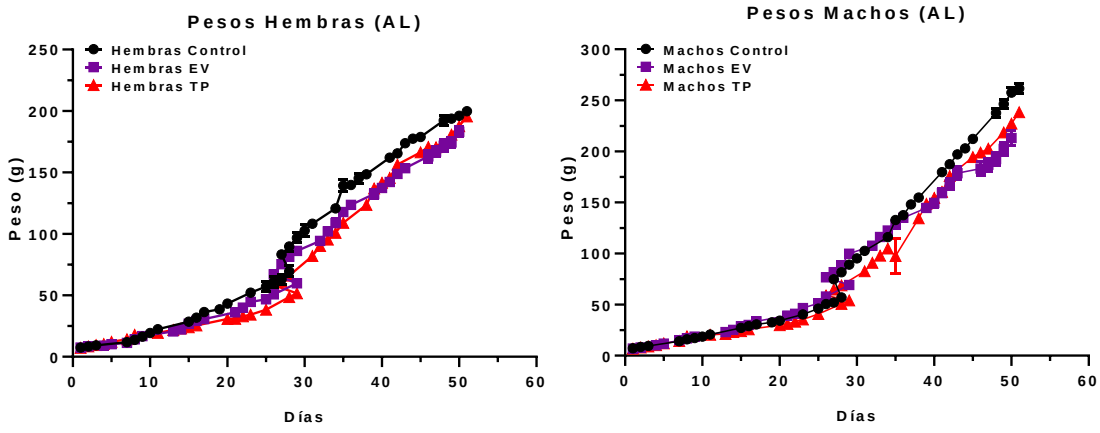


Figura 6.- Curvas de Peso de Ratas Hembras y Ratas Machos utilizadas en el protocolo de Actividad Locomotora. *Los datos representados en el gráfico muestran el promedio con su SEM (error estándar medio). El número de ratas hembras control utilizado fue de 9 (n=9), mientras que el de machos fue de 11 (n=11). El número de animales para EV fue igual para ambos sexos (n=10). Y para el grupo TP, las hembras presentaron un número de 7 (n=7) y el de machos fue de 6 (n=6).*

Figura 7

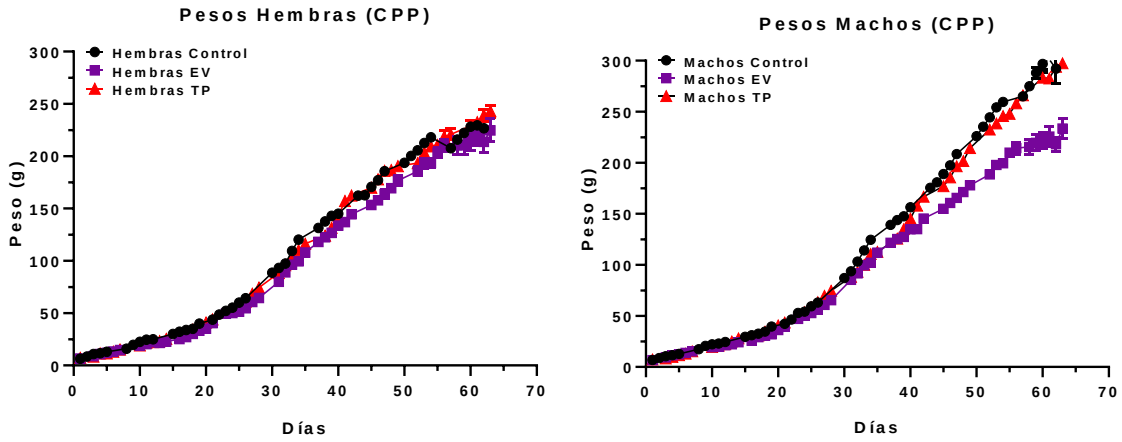


Figura 7.- Curvas de Peso de Ratas Hembras y Machos utilizadas en el protocolo de CPP. *Los datos representados en el gráfico muestran el promedio con su SEM (error estándar medio). El número de ratas hembras control fue de 5 (n=5) y el de los machos fue de 8 (n=8). El número de ratas hembras y machos EV fue de 5 para ambos (n=5). El número de animales TP fue de 6 para ambos sexos (n=6).*

6.1.2) Peso de Tejidos Sensibles a la Acción de Hormonas Sexuales en Ratas Hembras Adultas

La administración neonatal de las hormonas sexuales (EV y TP) produjo una reducción del tamaño de las gónadas de las hembras (Ovario Izquierdo: OI; Ovario Derecho: OD) utilizadas en los experimentos de actividad locomotora (Figura 8) y de CPP (Figura 9). La reducción del tamaño de las gónadas en las hembras adultas es un control positivo de la administración neonatal de hormonas sexuales que hemos observado previamente en otras series experimentales de nuestro laboratorio [36]. Estos resultados indican que la inyección con hormonas sexuales se realizó de manera correcta.

Figura 8

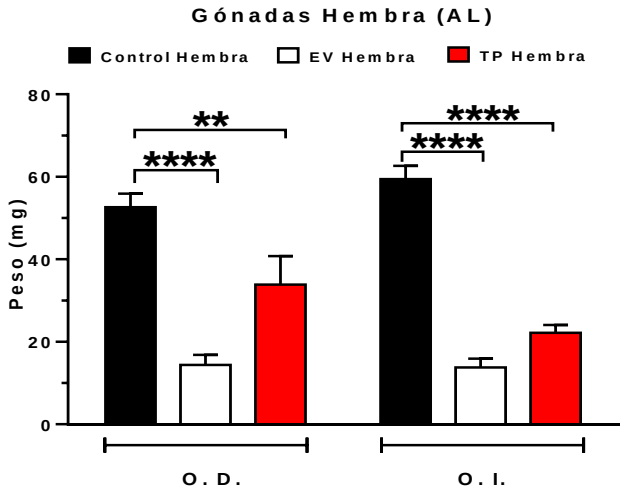


Figura 8. Pesos del tamaño de los ovarios derechos (OD) y ovarios izquierdos (OI) de ratas hembras control (OD: 52.6 ± 3.3 mg; OI: 59.4 ± 3.2 mg), ratas EV (OD: 14.4 ± 2.5 mg; OI: 13.8 ± 2.2 mg) y ratas TP (OD: 33.9 ± 7.0 mg; OI: 22.2 ± 1.9 mg) adultas expuestas durante las primeras horas de vida postnatal a hormonas sexuales y utilizadas en los experimentos de Actividad Locomotora (AL). Los datos se expresan como promedios ± SEM (error estándar medio) y el análisis estadístico utilizado fue ANOVA de una vía seguido de Newman-Keuls post-test (****P<0.0001; **P<0.01).

Figura 9

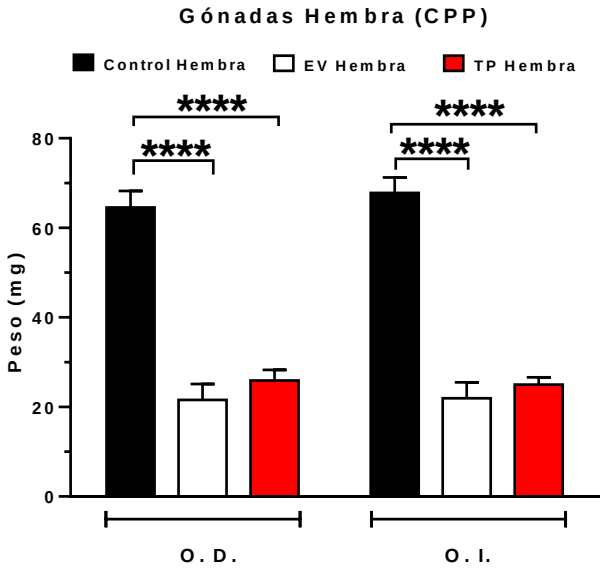


Figura 9. Pesos del tamaño de los ovarios derechos (OD) y ovarios izquierdos (OI) de ratas hembras control (OD: 64.6 ± 3.7 mg; OI: 67.8 ± 3.5 mg), ratas EV (OD: 21.6 ± 3.6 mg; OI: 21.9 ± 3.6 mg) y ratas TP (OD: 25.9 ± 2.4 mg; OI: 25.0 ± 1.6 mg) adultas expuestas durante las primeras horas de vida postnatal a hormonas sexuales y utilizadas en los experimentos de CPP. Los datos se expresan como promedios ± SEM (error estándar medio) y el análisis estadístico utilizado fue ANOVA de una vía seguido de Newman-Keuls post-test (****P<0.0001).

6.1.3) Peso de Tejidos Sensibles a la Acción de Hormonas Sexuales en Ratas Machos Adultas

Al igual que en las ratas hembras, la administración neonatal de las hormonas sexuales (EV y TP) produjo una reducción del tamaño de las gónadas de ratas machos (Testículo Izquierdo: TI; Testículo Derecho: TD) utilizadas en los experimentos de actividad locomotora (Figura 10) y de CPP (Figura 11). La reducción del tamaño de las gónadas en los machos adultos es un control positivo de la administración neonatal de hormonas sexuales que hemos observado previamente en otras series experimentales de nuestro laboratorio [6]. Estos resultados indican que la inyección con hormonas sexuales se realizó de manera correcta.

Figura 10

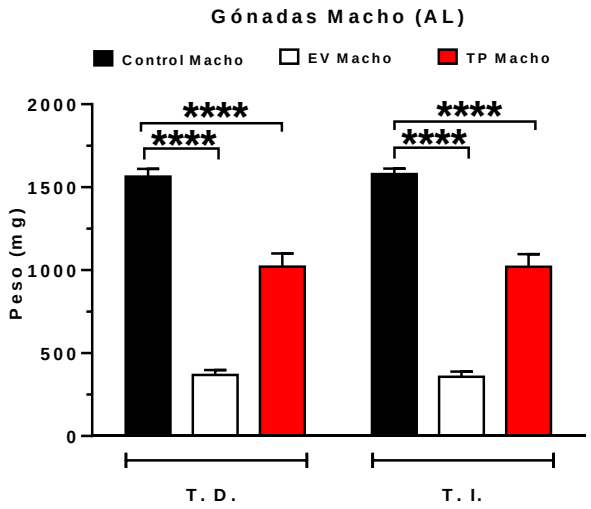


Figura 10. Pesos del tamaño de los testículos derechos (TD) y testículos izquierdos (TI) de ratas machos control (TD: 1563.8 ± 46.7 mg; TI: 1578.6 ± 33.1 mg), ratas EV (TD: 368.2 ± 29.5 mg; TI: 357.2 ± 30.8 mg) y ratas TP (TD: 1020.9 ± 79.3 mg; TI: 1019.9 ± 76.0 mg) adultas expuestas durante las primeras horas de vida postnatal a hormonas sexuales y utilizadas en los experimentos de Actividad Locomotora (AL). Los datos se expresan como promedios ± SEM (error estándar medio) y el análisis estadístico utilizado fue ANOVA de una vía seguido de Newman-Keuls post-test (****P<0.0001).

Figura 11

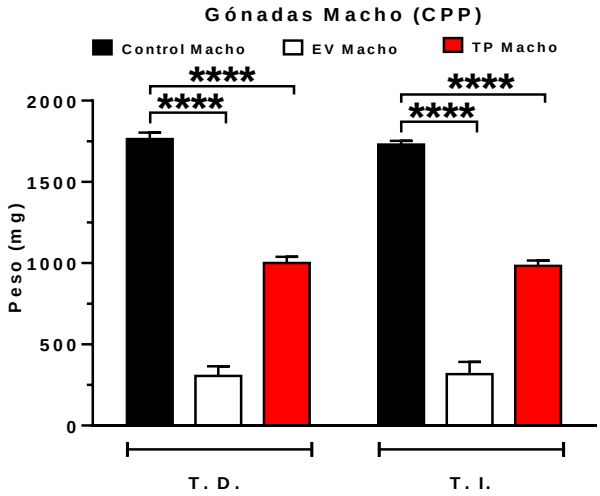


Figura 11. Pesos del tamaño de los testículos derechos (TD) y testículos izquierdos (TI) de ratas machos control (TD: 1763.0 ± 39.9 mg; TI: 1729.4 ± 23.0 mg), ratas EV (TD: 305.3 ± 59.1 mg; TI: 316.0 ± 75.6 mg) y ratas TP (TD: 1000.5 ± 37.9 mg; TI: 983.0 ± 32.5 mg) adultas expuestas durante las primeras horas de vida postnatal a hormonas sexuales y utilizadas en los experimentos de CPP. Los datos se expresan como promedios ± SEM (error estándar medio) y el análisis estadístico utilizado fue ANOVA de una vía seguido de Newman-Keuls post-test (****P<0.0001).

6.1.4) Efecto de Administración Neonatal de EV Sobre la Ciclicidad Estral de Ratas Hembras Adultas. Comparación con Ratas Hembras Control.

Otro control interno que se utiliza en nuestro laboratorio para verificar que la administración neonatal de EV fue efectiva, es medir la ciclicidad estral de las ratas. Al igual que lo observado en esta tesis, antecedentes en la literatura han demostrado que las ratas tratadas con EV presentan una aciclicidad estral producida principalmente por una disminución del tamaño de las gónadas y de las estructuras responsables de promover los ciclos estrales [36,37]. Esta aciclicidad estral fue observada en ratas EV utilizadas en los experimentos de actividad locomotora (Figura 12) y de CPP (Figura 13). Cabe señalar, que a ratas hembras tratadas con TP no se pudo realizar frotis vaginales, ya que estas ratas presentan una agénesis que impide tomar muestras para determinar el ciclo estral. Este experimento se realizó para comprobar que las ratas EV no ciclan, mientas que las ratas controles, sí. Esto indica que la inyección con hormonas sexuales se realizó de manera correcta.

Figura 12

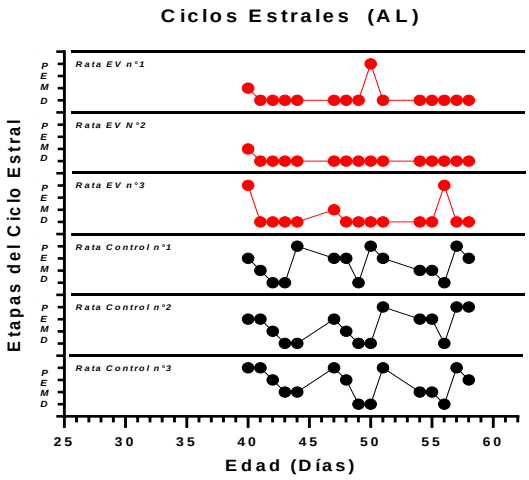


Figura 12. Ciclos Estrales representativos de las ratas utilizadas en el protocolo de Actividad Locomotora (AL). Comparación entre ratas hembras controles (puntos y líneas negras) versus ratas hembras EV (puntos y líneas rojas).

Figura 13

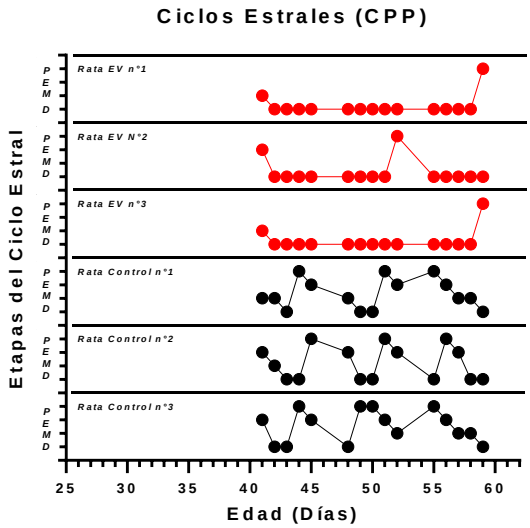


Figura 13. Ciclos Estrales representativos de las ratas utilizadas en el protocolo de CPP. Comparación entre ratas hembras controles (puntos y líneas negras) versus ratas hembras EV (puntos y líneas rojas).

6.2) Efectos de la Reprogramación Neonatal con Hormonas Sexuales sobre la Actividad Locomotora inducida por Metilfenidato en Ratas Hembras Adultas.

De acuerdo a la actividad locomotora en ratas hembras, se observó que en el curso temporal (Figura 14) no hubo diferencias significativas en cuanto a la actividad locomotora basal ni inducida por la inyección de salino (1 mL/Kg i.p.). Sin embargo, se aprecia una diferencia significativa entre los grupos al comparar la actividad locomotora inducida por metilfenidato (5 mg/Kg i.p.). Esta diferencia se hace evidente cuando se gráfica la actividad locomotora acumulativa inducida por metilfenidato, observándose que ratas hembras TP tienen una disminución significativa respecto a ratas control (Figura 15). Esto sugiere que las ratas control y EV tienen una sensibilidad mayor a la droga, que las ratas tratadas con testosterona propionato.

Figura 14

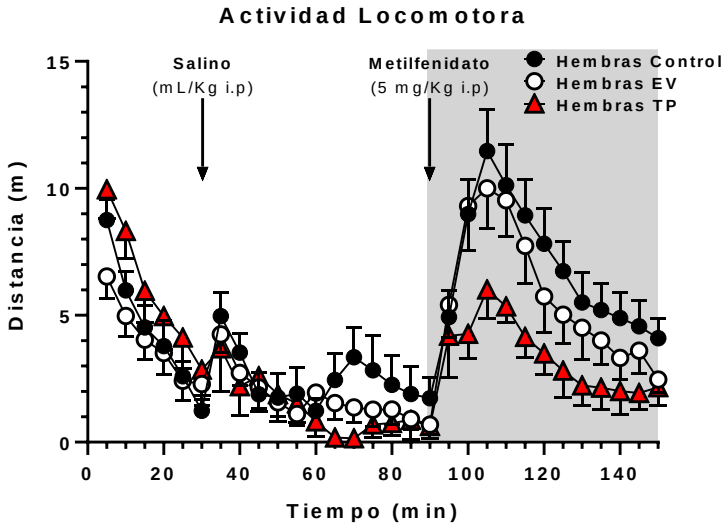


Figura 14. Actividad Locomotora en curso temporal basal (0-30 min), inducida por la inyección de Salino (1 mL/Kg i.p.) e inducida por la inyección de metilfenidato (5 mg/Kg i.p.) en ratas hembras adultas expuestas durante las primeras 12 horas de vida postnatal a aceite de sésamo (n = 9), EV (n = 10) y TP (n = 7). Los datos se expresan como promedios ± SEM (error estándar medio).

Figura 15

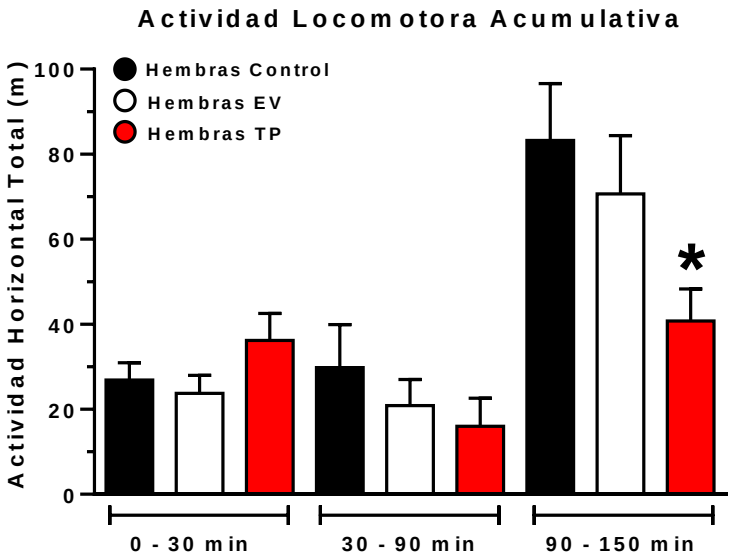


Figura 15. Actividad Locomotora acumulativa basal (0-30 min), inducida por la inyección de Salino (1 mL/Kg i.p.) e inducida por la inyección de metilfenidato (5 mg/Kg i.p.) en ratas hembras adultas expuestas durante las primeras 12 horas de vida postnatal a aceite de sésamo (n = 9), EV (n = 10) y TP (n = 7). Los datos se expresan como promedios ± SEM (error estándar medio) y el análisis estadístico utilizado fue ANOVA de una vía seguido de Fisher's LSD test (*P<0.05).

6.3) Efectos de la Reprogramación Neonatal con Hormonas Sexuales sobre la Actividad Locomotora inducida por Metilfenidato en Ratas Machos Adultas.

De acuerdo a la actividad locomotora en ratas machos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el curso temporal (Figura 16) y en la actividad locomotora acumulativa (Figura 17) en la locomoción basal, inducida por la inyección de salino (1 mL/Kg i.p.) o en la actividad locomotora inducida por metilfenidato (5 mg/Kg i.p.). Esto sugiere que los machos son similarmente sensibles entre tratamientos, a una dosis aguda de la droga utilizada.

Figura 16

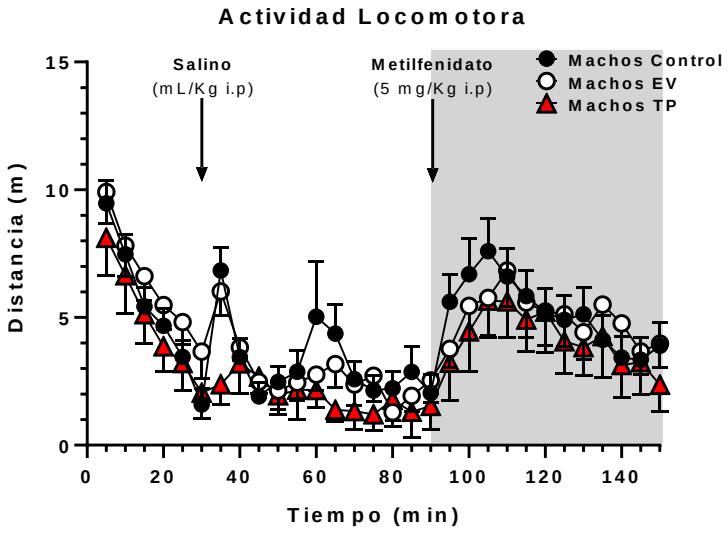


Figura 16. Actividad Locomotora en curso temporal basal (0-30 min), inducida por la inyección de Salino (1 mL/Kg i.p.) e inducida por la inyección de metilfenidato (5 mg/Kg i.p.) en ratas machos adultas expuestas durante las primeras 12 horas de vida postnatal a aceite de sésamo (n = 11), EV (n = 10) y TP (n = 6). Los datos se expresan como promedios ± SEM (error estándar medio).

Figura 17

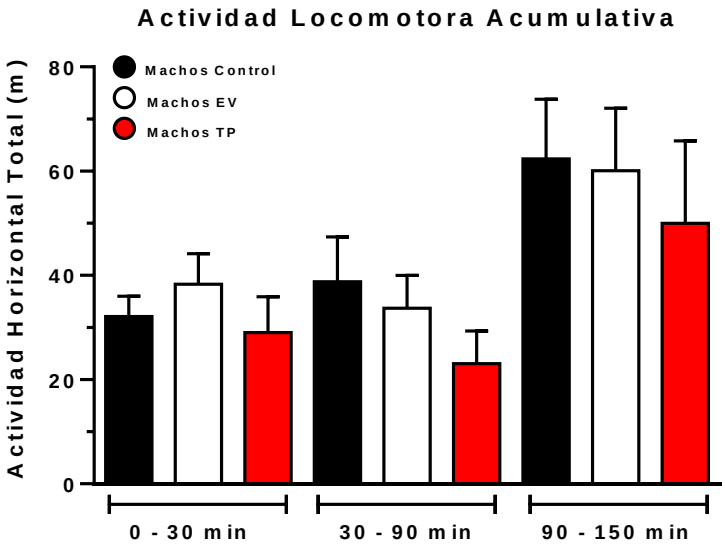


Figura 17. Actividad Locomotora acumulativa basal (0-30 min), inducida por la inyección de Salino (1 mL/Kg i.p.) e inducida por la inyección de metilfenidato (5 mg/Kg i.p.) en ratas hembras adultas expuestas durante las primeras 12 horas de vida postnatal a aceite de sésamo (n = 11), EV (n = 10) y TP (n = 6). Los datos se expresan como promedios ± SEM (error estándar medio).

6.4) Diferencias Sexuales a los Efectos Recompensantes de Metilfenidato en Ratas Hembras y Machos Adultas.

Al analizar las posibles diferencias sexuales en los resultados de esta tesis, se pudo observar que tras la administración de metilfenidato (90 – 150 min) las ratas hembras control tienen una actividad locomotora significativamente mayor que ratas machos control. Mientras que en la actividad locomotora basal e inducida por la inyección de solución salina no se observaron diferencias. Estos resultados nos sugieren que las hembras son más sensibles a los efectos farmacológicos del metilfenidato.

Figura 18

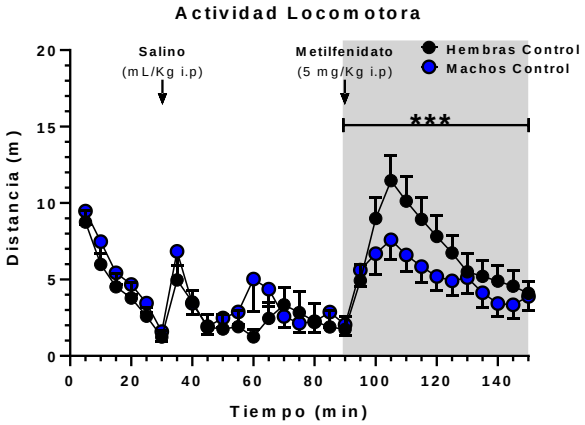


Figura 28. Actividad Locomotora en curso temporal basal (0-30 min), inducida por la inyección de Salino (1 mL/Kg i.p.) e inducida por la inyección de metilfenidato (5 mg/Kg i.p.) en ratas hembras (n = 9) y machos (n = 11) control. Los datos se expresan como promedios ± SEM (error estándar medio) y el análisis estadístico utilizado fue ANOVA de dos vías (90-150 min) (Sexo: [$F_{(1, 234)} = 13.12$, P=0,0004]; Tiempo: [$F_{(12, 234)} = 7.254$, P<0,0001]; Interacción: [$F_{(12, 234)} = 0.8516$, P=0,5972]).

6.5) Efectos de la Reprogramación Neonatal con Hormonas Sexuales sobre la Expresión de DAT en NAcc y CE en Ratas Hembras Adultas.

Para determinar si la disminución de la actividad locomotora observada en ratas hembras adultas reprogramadas con hormonas sexuales durante las primeras 12 horas de vida postnatal está relacionada con una disminución de la expresión de DAT, se decidió cuantificar la expresión de este transportador en NAcc y CE. La Figura 19 muestra que no hubo diferencias en la expresión de DAT no glicosilado (69 KDa) en NAcc ni en CE. Sin embargo, la expresión de DAT glicosilado (80 KDa), que corresponde a la proteína funcional, disminuyó significativamente en ratas TP (Figura 20, Panel A y B).

Figura 19

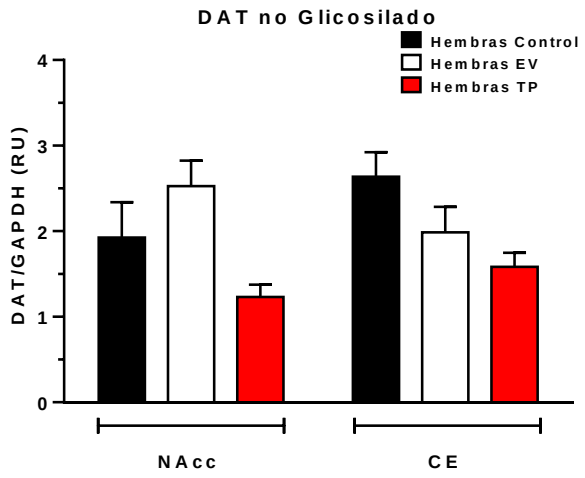


Figura 18. Expresión de DAT no glicosilado en NAcc y en CE en ratas hembras controles (n = 9), EV (n = 10) y TP (n = 7). Los datos se expresan como promedios ± SEM (error estándar medio).

Figura 20

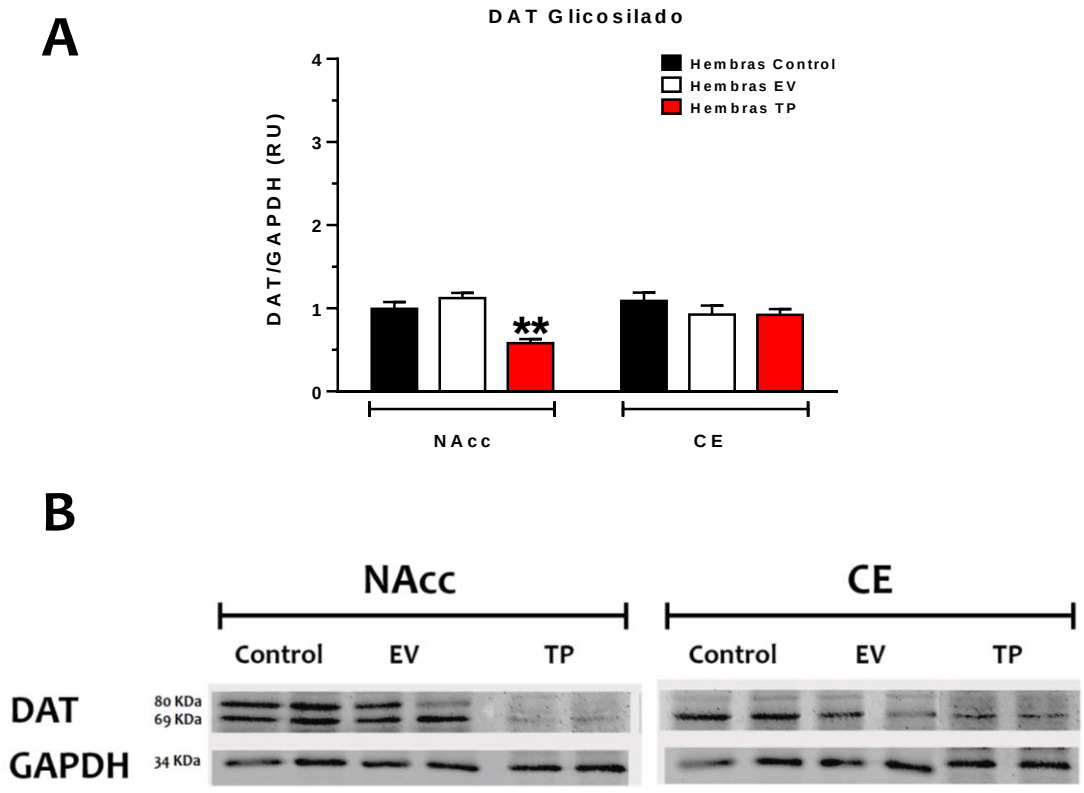


Figura 19. Expresión de DAT glicosilado en NAcc y en CE en ratas hembras controles (n = 9), EV (n = 10) y TP (n = 7). A: Los datos se expresan como promedios ± SEM (error estándar medio) y el análisis estadístico utilizado fue ANOVA de una vía seguido de Fisher's LSD test (**P<0.01). **B:** Imagen representativa de los Western-Blots obtenidos para cada tratamiento (Control, EV y TP). Las bandas a 80 KDa representan a DAT glicosilado y la de 69 kDa a DAT no glicosilado.

6.6) Efectos de la Reprogramación Neonatal con Hormonas Sexuales sobre la Expresión de DAT en NAcc y CE en Ratas Machos Adultas.

La Figura 21 muestra que no hubo diferencias estadísticamente significativas en la expresión de DAT no glicosilado (69 KDa) en NAcc ni en CE. Sin embargo, la expresión de DAT glicosilado (80 KDa) disminuyó significativamente en ratas TP (Figura 22, Panel A y B).

Figura 21

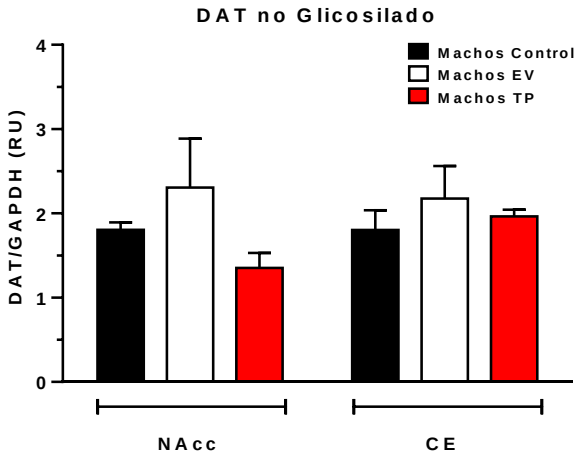


Figura 20. Expresión de DAT no glicosilado en NAcc y en CE en ratas machos controles (n = 11), EV (n = 10) y TP (n = 6). Los datos se expresan como promedios ± SEM (error estándar medio).

Figura 22

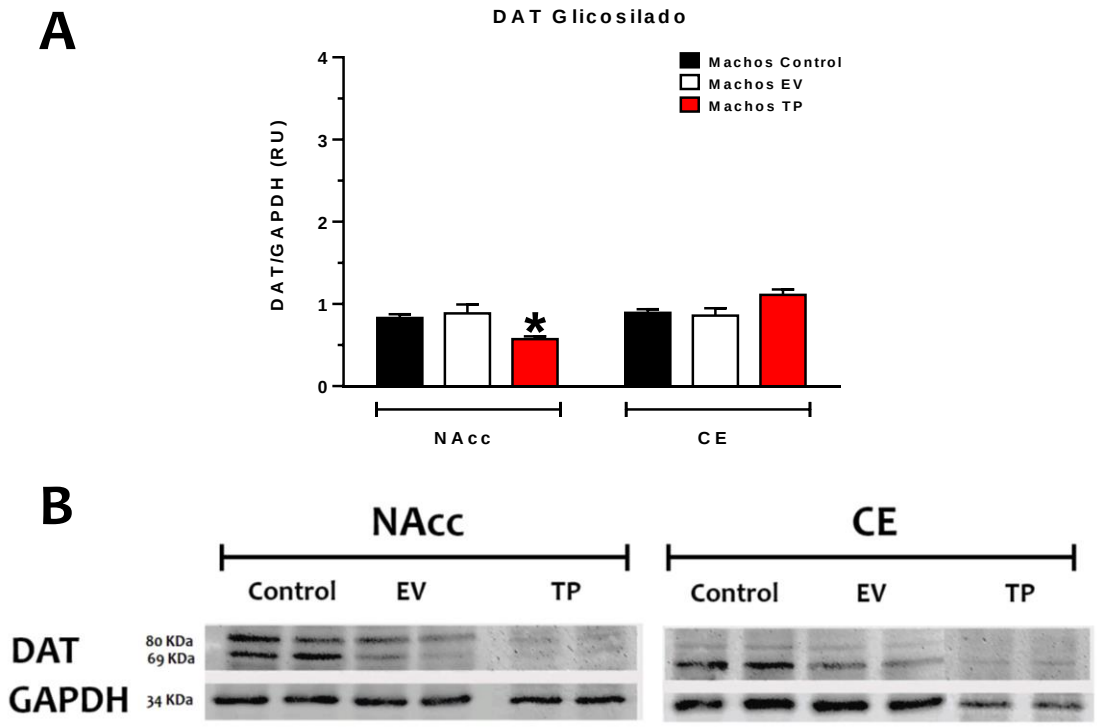


Figura 21. Expresión de DAT glicosilado en NAcc y en CE en ratas hembras controles (n = 11), EV (n = 10) y TP (n = 6). A: Los datos se expresan como promedios ± SEM (error estándar medio) y el análisis estadístico utilizado fue ANOVA de una vía seguido de Fisher's LSD test (*P<0.05). **B:** Imagen representativa de los Western-Blots obtenidos para cada tratamiento (Control, EV y TP). Las bandas a 80 KDa representan a DAT glicosilado y la de 69 kDa a DAT no glicosilado.

6.7) Efectos de la Reprogramación Neonatal con Hormonas Sexuales sobre la Preferencia de Lugar Condicionada a Metilfenidato en Ratas Hembras Adultas.

Los resultados obtenidos muestran que las ratas hembra controles se condicionan con la administración de metilfenidato (Barras Negras) versus ratas hembra control que recibieron la administración de solución salina fisiológica (Barras Blancas) al PND-60. Al utilizar el criterio de condicionamiento efectivo T60 (ver materiales y métodos), se observó que 3 ratas hembras control, de un total de 5 que recibieron la inyección de metilfenidato se condicionaron, representando un 60% del grupo.

Figura 23

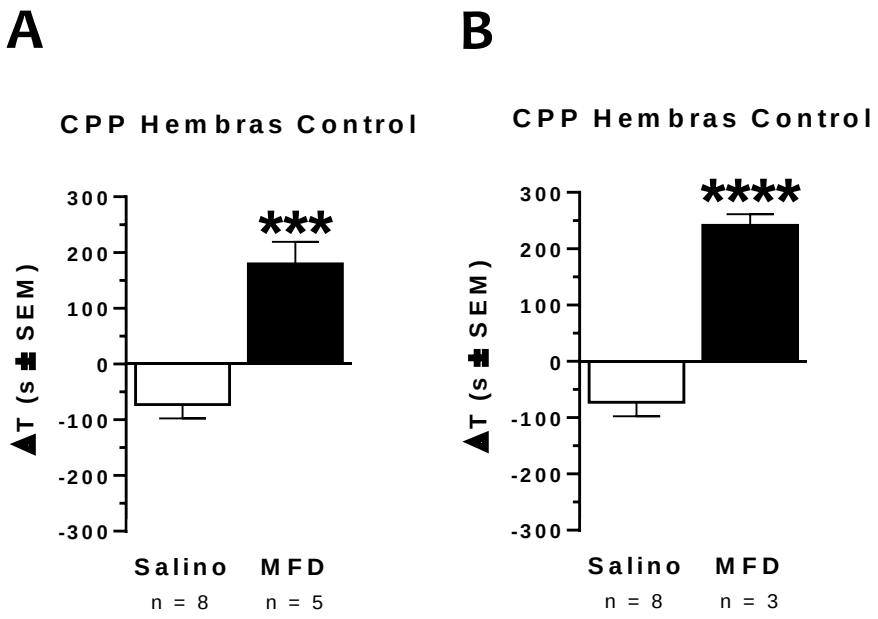


Figura 22. Las figuras A y B muestran la diferencia de tiempo (ΔT) en segundos que corresponde a la diferencia del tiempo entre el test y el pre-test en la cámara de menor preferencia pareada a los efectos de metilfenidato (barras negras) o a la administración de solución salina fisiológica (barras blancas) en ratas hembras control. El Panel A muestra el condicionamiento a metilfenidato en el total de las ratas hembras control y el Panel B sólo las ratas hembras control condicionadas según el criterio T60. Los datos se expresan como promedios ± SEM (error estándar medio) y el análisis estadístico utilizado fue por t-test (*** P<0,001 y **** P<0,0001).

Por otro lado, la administración neonatal de EV en ratas hembras también produjo un condicionamiento a los efectos recompensantes del metilfenidato (Barras Azules) respecto a la inyección de solución salina fisiológica (Barras Blancas) al PND-60 (Figura 24, Panel A). Al utilizar el criterio de condicionamiento efectivo T60, se observó que 2 ratas hembras EV, de un total de 5 que recibieron la inyección de metilfenidato se condicionaron, representando un 40% del grupo (Figura 24, Panel B).

Figura 24

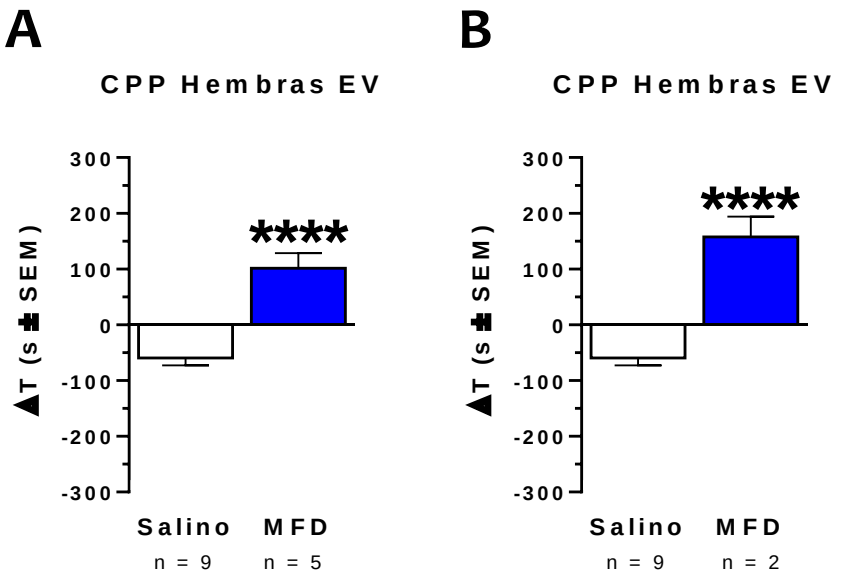


Figura 23. Las figuras A y B muestran la diferencia de tiempo (ΔT) en segundos que corresponde a la diferencia del tiempo entre el test y el pre-test en la cámara de menor preferencia pareada a los efectos de metilfenidato (barras azules) o a la administración de solución salina fisiológica (barras blancas) en ratas hembras EV. El Panel A muestra el condicionamiento a metilfenidato en el total de las ratas hembras EV y el Panel B sólo las ratas hembras EV condicionadas según el criterio T60. Los datos se expresan como promedios ± SEM (error estándar medio) y el análisis estadístico utilizado fue por t-test (**** P<0,0001).

Respecto a la administración neonatal de TP en ratas hembras, también se produjo un condicionamiento a los efectos recompensantes del metilfenidato (Barras Rojas) respecto a la inyección de solución salina fisiológica (Barras Blancas) al PND-60 (Figura 25, Panel A). Al utilizar el criterio de condicionamiento efectivo T60, se observó que 3 ratas hembras TP, de un total de 6 que recibieron la inyección de metilfenidato se condicionaron, representando un 50% del grupo (Figura 25, Panel B).

Figura 25

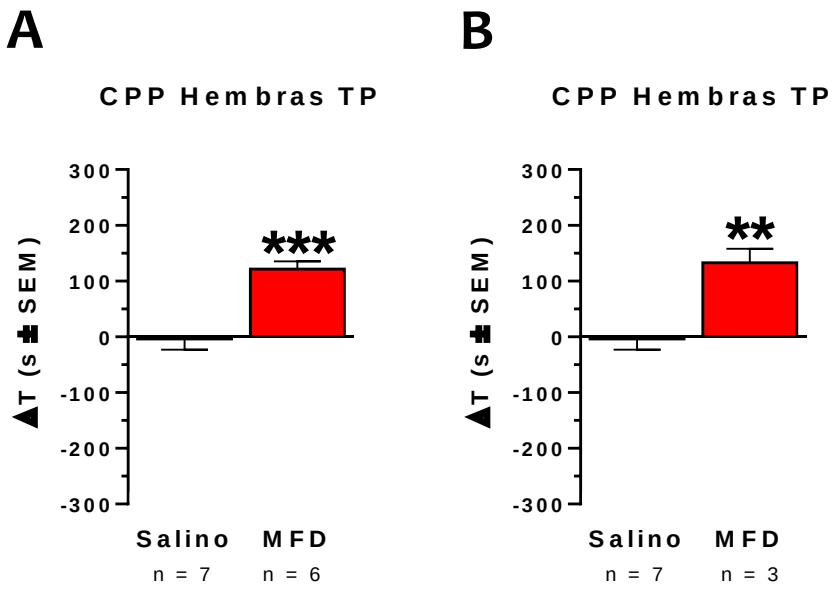


Figura 24. Las figuras A y B muestran la diferencia de tiempo (ΔT) en segundos que corresponde a la diferencia del tiempo entre el test y el pre-test en la cámara de menor preferencia pareada a los efectos de metilfenidato (barras rojas) o a la administración de solución salina fisiológica (barras blancas) en ratas hembras TP. El Panel A muestra el condicionamiento a metilfenidato en el total de las ratas hembras TP y el Panel B sólo las ratas hembras TP condicionadas según el criterio T60. Los datos se expresan como promedios ± SEM (error estándar medio) y el análisis estadístico utilizado fue por t-test (******** P<0,0001).

6.8) Efectos de la Reprogramación Neonatal con Hormonas Sexuales sobre la Preferencia de Lugar Condicionada a Metilfenidato en Ratas Machos Adultas.

Los resultados obtenidos muestran que las ratas machos controles se condicionan con la administración de metilfenidato (Barras Negras) versus ratas machos control que recibieron la administración de solución salina fisiológica (Barras Blancas) al PND-60. Al utilizar el criterio de condicionamiento efectivo T60, se observó que 4 ratas machos control, de un total de 7 que recibieron la inyección de metilfenidato se condicionaron, representando un 57.1% del grupo.

Figura 26

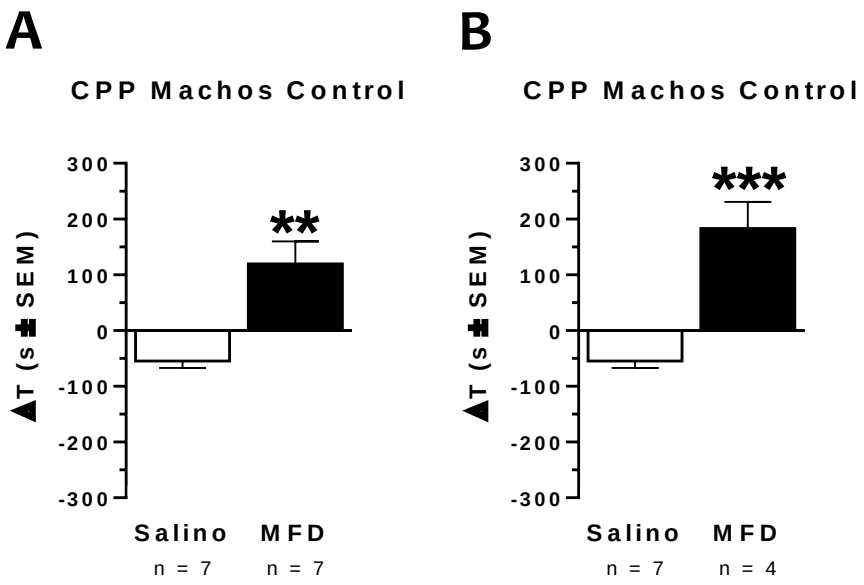


Figura 25. Las figuras A y B muestran la diferencia de tiempo (ΔT) en segundos que corresponde a la diferencia del tiempo entre el test y el pre-test en la cámara de menor preferencia pareada a los efectos de metilfenidato (barras negras) o a la administración de solución salina fisiológica (barras blancas) en ratas machos control. El Panel A muestra el condicionamiento a metilfenidato en el total de las ratas machos control y el Panel B sólo las ratas machos control condicionadas según el criterio T60. Los datos se expresan como promedios ± SEM (error estándar medio) y el análisis estadístico utilizado fue por t-test (*** P<0,001 y ** P<0,01).

Por otro lado, la administración neonatal de EV en ratas machos no produce el condicionamiento a los efectos recompensantes del metilfenidato (Barras Azules) respecto a la inyección de solución salina fisiológica (Barras Blancas) al PND-60 (Figura 27, Panel A). Al utilizar el criterio de condicionamiento efectivo T60, se observó que 1 rata macho EV, de un total de 5 que recibieron la inyección de metilfenidato se condicionó, representando un 20% del grupo (Figura 27, Panel B).

Figura 27

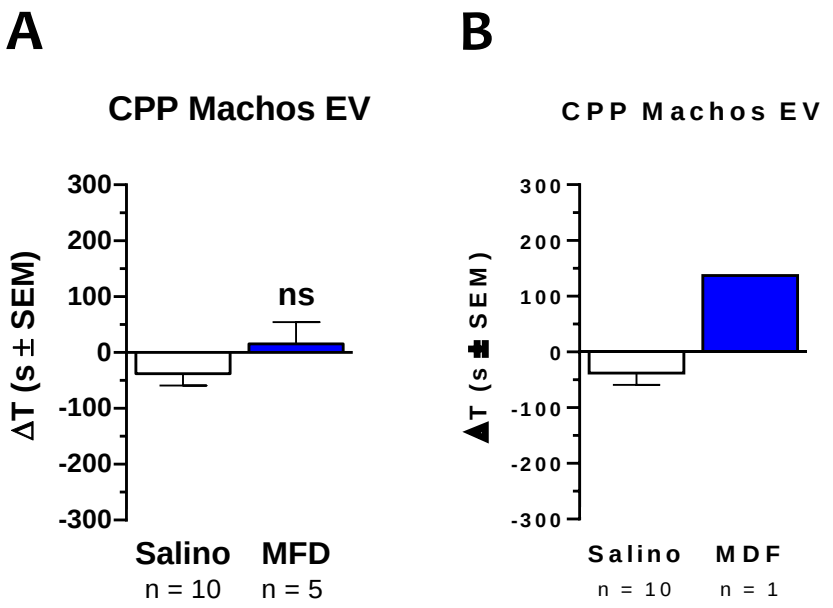


Figura 26. Las figuras A y B muestran la diferencia de tiempo (ΔT) en segundos que corresponde a la diferencia del tiempo entre el test y el pre-test en la cámara de menor preferencia pareada a los efectos de metilfenidato (barras azules) o a la administración de solución salina fisiológica (barras blancas) en ratas machos EV. El Panel A muestra el condicionamiento a metilfenidato en el total de las ratas machos EV y el Panel B sólo la rata macho EV condicionada según el criterio T60. Los datos se expresan como promedios ± SEM (error estándar medio) y el análisis estadístico utilizado fue por t-test (ns: no significante).

Respecto a la administración neonatal de TP en ratas machos, no se observó un condicionamiento a los efectos recompensantes del metilfenidato (Barras Rojas) respecto a la inyección de solución salina fisiológica (Barras Blancas) al PND-60 (Figura 28, Panel A). Al utilizar el criterio de condicionamiento efectivo T60, se observó que 2 ratas machos TP, de un total de 6 que recibieron la inyección de metilfenidato se condicionaron, representando un 33.3% del grupo (Figura 28, Panel B).

Figura 28

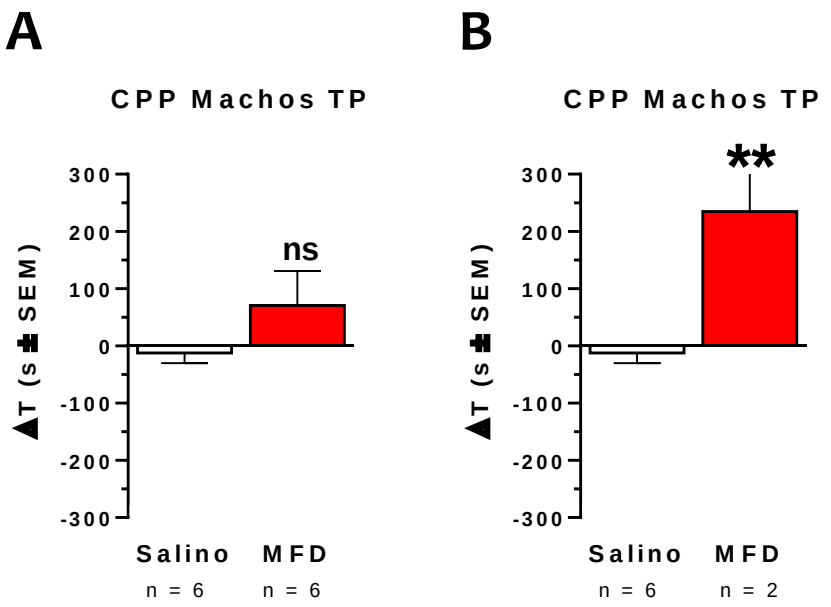


Figura 27. Las figuras A y B muestran la diferencia de tiempo (ΔT) en segundos que corresponde a la diferencia del tiempo entre el test y el pre-test en la cámara de menor preferencia pareada a los efectos de metilfenidato (barras rojas) o a la administración de solución salina fisiológica (barras blancas) en ratas machos TP. El Panel A muestra el condicionamiento a metilfenidato en el total de las ratas machos TP y el Panel B sólo las ratas machos TP condicionadas según el criterio T60. Los datos se expresan como promedios ± SEM (error estándar medio) y el análisis estadístico utilizado fue por t-test (** P<0,01; ns: no significante).

7) DISCUSIÓN

En nuestro laboratorio se ha trabajado con el concepto de reprogramación neonatal con hormonas sexuales en la búsqueda de factores de vulnerabilidad a la adicción a drogas de abuso que pudiesen explicar cómo algunos individuos escalan rápidamente en el consumo de drogas y otros no. En este sentido, resultados previos del laboratorio han demostrado que a nivel celular, neuroquímico y funcional existen diferencias entre animales adultos controles y tratados durante las primeras horas de vida postnatal con hormonas sexuales. Así por ejemplo, hemos observado en tesis previas de nuestro laboratorio que en ratas EV la liberación de DA inducida por anfetamina en NAcc es menor a la observada en ratas control [38], la cual se traduce a nivel funcional en un menor CPP a la misma droga [39]. Sin embargo, a pesar de que estos interesantes resultados fueron realizados con anfetamina, la cual tiene un sitio de unión específico a DAT y un mecanismo de acción particular (favorecer la reversión en el flujo de DA a través del transportador) [40], nos surgió la pregunta de investigación que si al usar metilfenidato, un bloqueador de DAT, que se une a otro sitio específico del transportador, se observarían efectos similares a los observados con anfetamina en nuestro modelo experimental.

7.1) Efectos de la Reprogramación Neonatal con Hormonas Sexuales sobre Tejidos Sensibles

En nuestro laboratorio se ha determinado que la exposición a hormonas sexuales en edades tempranas (PND-1), produce efectos a largo plazo en tejidos sensibles a la

acción de estas hormonas, observándose por ejemplo la reducción del tamaño de las gónadas. En este sentido, los animales utilizados en nuestros experimentos conductuales, que fueron tratados durante las primeras horas de vida con EV y TP, presentan en la vida adulta una reducción del tamaño de las gónadas similar a la observada previamente [4,6,36,37]. En el caso de las hembras tratadas con EV y TP, la reducción del tamaño de la gónada ha sido asociada a una reducción en el número de cuerpos lúteos (estructuras ováricas de gran tamaño), que indicarían la ausencia de ovulación y que en nuestras ratas es evidenciada como una aciclicidad estral. En el caso de los machos tratados con EV y TP, la reducción del tamaño de las gónadas se debe a una hipotrofia mediada por hipoactivación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada, que en nuestros resultados ha sido asociado a una disminución del tamaño de la hipófisis y a niveles plasmáticos de Testosterona significativamente menores respecto a ratas machos control [6]. Sin duda, estos resultados son parte de nuestros controles internos que nos indican que los animales expuestos a hormonas sexuales durante las primeras horas de vida recibieron una dosis efectiva de las mismas.

7.2) Rol de la Reprogramación Neonatal con Hormonas Sexuales sobre los Efectos Recompensantes de Metilfenidato

Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que las ratas hembras control tienen una mayor sensibilidad a los efectos recompensantes de metilfenidato (5 mg/Kg i.p.) que las ratas machos control. El curso temporal de la actividad locomotora inducida por metilfenidato en hembras control es significativamente mayor que la

producida en ratas machos control (Figura 18), sin observarse cambios en la locomoción basal asociada a la exploración de un nuevo espacio (primeros 30 min), ni a la inducida por la inyección de solución salina fisiológica. Estos datos se correlacionan con antecedentes descritos en la literatura [26,41], en donde se ha demostrado que los estrógenos potencian los efectos recompensantes de las drogas de abuso y a nivel celular favorecen la liberación de DA inducida por psicoestimulantes [41,42]. Por el contrario, la menor actividad locomotora observada en machos podría ser también explicada por antecedentes de la literatura que demuestran un posible rol antirecompensante de los andrógenos [43], haciendo a las ratas hembras más sensibles a los efectos recompensantes de las drogas de abuso.

Respecto a la preferencia de lugar condicionado a metilfenidato, se observó que el porcentaje de condicionamiento en ratas machos control fue un 57.1%, muy similar al obtenido en ratas hembras control (60%). Estos resultados nos sugieren que frente a la administración repetida de la droga, la diferencia sexual observada en el protocolo de actividad locomotora (sólo una dosis) se pierde, posiblemente a varios factores no controlables. Por ejemplo, las ratas hembras control tenían ciclos estrales normales, observándose cada ciclo estral completo en un intervalo de 5 días (ver descripción de ciclo estral en sección materiales y métodos). Esto es importante, ya que el protocolo de condicionamiento a metilfenidato duró 5 días (con una administración diaria de la droga), que durante este tiempo se asoció a niveles de estrógenos plasmáticos que variaron de niveles basales-bajos (Diestro) a niveles plasmáticos altos (Proestro). Por lo

cual, estas fluctuaciones en los estrógenos plasmáticos pudieron reducir el valor recompensante de la droga durante el periodo de condicionamiento a niveles similares a los observados en ratas machos control. Esta variabilidad en la respuesta conductual dependiente de los estrógenos plasmáticos ha sido previamente descrita en la literatura, observándose que ratas hembras gonadectomizadas no se condicionan a los efectos recompensantes de anfetamina (respecto a ratas control), mientras que al reemplazar con E_2 a las ratas hembras gonadectomizadas, se logra la preferencia de lugar condicionada a anfetamina [24].

Respecto a la reprogramación neonatal con hormonas sexuales, se observó que la actividad locomotora inducida por metilfenidato en ratas hembras TP fue significativamente menor a la observada en ratas hembras control y tratadas con EV. En este sentido, la exposición neonatal a TP produjo en las mismas ratas que se realizó el test conductual, una disminución en la expresión de DAT (blanco farmacológico de la acción del metilfenidato) en NAcc (área cerebral asociada a los efectos recompensantes del metilfenidato). Un efecto similar al descrito en esta tesis, fue el observado previamente por nuestro laboratorio en que ratas hembras tratadas con EV tuvieron una menor actividad locomotora inducida por anfetamina [36].

Respecto a la administración neonatal a EV no se observó en esta tesis cambios en la expresión de DAT en NAcc ni tampoco una disminución significativa en la actividad locomotora inducida por metilfenidato, lo que nos haría suponer que los distintos mecanismos de acción de estas drogas (anfetamina y metilfenidato) son importantes

para ver los efectos farmacológicos observados en las ratas hembras EV. Por ejemplo, podría ser de interés estudiar si proteínas río debajo de DAT que dan cuenta de su actividad dependiente de anfetamina, como la proteína kinasa C que fosforila a DAT, pudiera también ser modulada por la administración neonatal de E_2. Sin embargo, el bloqueo en el sitio externo de DAT por parte del metilfenidato [30] no se vería afectado en ratas hembras EV, observándose un efecto farmacológico similar al de ratas hembras control.

Respecto a la exposición neonatal a TP se observó que sólo afectó la locomoción en ratas hembras (en comparación con las ratas hembras control) y no en ratas machos tratados con esta hormona. Esto podría explicarse desde el punto de vista mecanístico, ya que la expresión del DAT en machos varía en menor proporción que en las hembras, por lo tanto el comportamiento farmacológico inducido por la droga es similar al observado en ratas machos control. Por otro lado, a nivel neuroquímico también podrían producirse cambios inducidos por las hormonas sexuales sobre enzimas catabolizadoras que deberían ser considerados. En este sentido, se ha demostrado que enzimas como la monoamino oxidasa (MAO) y catecol-*o*-metiltransferasa (COMT) aumentan su expresión en Sustancia Nigra de ratas machos adolescentes tratadas con TP y DHT, llevando a una mayor metabolización de DA [44]. Esto podría estar relacionado a los menores efectos farmacológicos inducidos por metilfenidato que observamos en los estudios conductuales respecto a ratas hembras. En futuras tesis, se debería medir el contenido tisular y la liberación de DA inducida por

metilfenidato en ratas control y tratadas con hormonas sexuales para relacionar la conducta con la neuroquímica.

Interesantemente, a nivel electrofisiológico se ha observado que en ratas Sprague-Dawley hembras la frecuencia de los mEPSC (corriente excitatorias post sinápticas pequeñas, del inglés *"miniature excitatory postsynaptic current"*) en MSN (neuronas espinosas medianas, del inglés *"medium spiny neurons"*) del NAcc es mayor que en ratas machos [45]. Sin embargo, la administración neonatal a E o T evita esta diferencia sexual [45] y demuestra que el NAcc es un área sensible al efecto del aumento de hormonas sexuales en la pubertad [45].

En estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que la exposición neonatal a EV reduce los efectos conductuales y neuroquímicos de anfetamina [36,39], sin embargo como hemos visto en los resultados de esta tesis los efectos conductuales inducidos por la administración de metilfenidato, no se ven afectados en ratas adultas expuestas durante las primeras horas de vida postnatal a EV. Una posible explicación podría ser que en estudios recientes se ha descrito que metilfenidato activa a receptores de dopamina tipo 1 (D_1), acoplados a proteína Gs, que podría favorecer la neurotransmisión en NAcc [46]. En este sentido, el efecto agonista de metilfenidato sobre D_1 puede contrarrestar el efecto de la reprogramación neonatal de EV. Trabajos que se están realizando actualmente en nuestro laboratorio podrán responder en un futuro, si es que EV puede afectar la expresión de D_1.

7.3) Rol de la Reprogramación Neonatal con Hormonas Sexuales sobre la Expresión de DAT en NAcc y CE de ratas adultas

En esta tesis se midió la cantidad de DAT glicosilado y no glicosilado. El DAT es glicosilado por modificaciones post-traduccionales que ocurren a nivel del Aparato de Golgi [47]. Estas glicosilaciones son importantes para la integración de DAT en la membrana y para producir la captación de DA desde el espacio extracelular [47]. Por lo tanto, cambios en la expresión de DAT glicosilado dan cuenta de cambios en la proteína funcional. En este sentido, las ratas hembras tratadas con TP al PND-1 tuvieron una menor locomoción inducida por metilfenidato que ratas tratadas con EV y controles. Este resultado conductual se relaciona directamente con la menor expresión de DAT glicosilado en NAcc y que farmacológicamente da cuenta de la menor eficacia de la dosis administrada de metilfenidato en los test conductuales. Como el DAT es el blanco farmacológico del metilfenidato y al haber menor expresión de esta proteína, se podría deducir que los efectos conductuales inducidos por la droga serían menores a los observados en ratas control. La confirmación de esta relación entre DAT y locomoción, la podemos observar en las ratas hembras control y EV que tuvieron una locomoción similar y niveles de expresión de DAT en NAcc similares entre ambos grupos experimentales.

7.4) Proyecciones Futuras

Como proyecciones futuras de esta tesis se hace necesario realizar ambos protocolos conductuales en ratas hembras y machos adultas expuestas durante las primeras horas de vida postnatal a DHT (dihidrotestosterona: un andrógeno no aromatizable), para discriminar que los efectos observados en ratas tratadas con TP se deben a un efecto androgénico o a un efecto estrogénico producido por la aromatización parcial de la testosterona.

Otro experimento que debería hacerse es la medición de la expresión de DAT en ratas control y tratadas con hormonas sexuales que fueron sometidas al protocolo de CPP. Así de esta manera podríamos relacionar los efectos conductuales de metilfenidato en el CPP con los niveles de expresión de DAT.

8) CONCLUSIONES

La administración neonatal de TP reduce la actividad locomotora inducida por metilfenidato en ratas hembras adultas, que se asocia a una reducción en la expresión de DAT glicosilado en NAcc.

De igual manera en ratas machos tratadas con TP se observa que la administración repetida de metilfenidato no produce una preferencia de lugar condicionada a la droga. Posiblemente, como lo demuestran los resultados de expresión de DAT glicosilado en ratas machos TP, nos muestran una reducción significativa del CPP, pero no de la locomoción, por lo cual se hace necesario medir esta expresión post protocolo de CPP en los grupos experimentales.

Finalmente, la hipótesis de esta tesis se cumplió parcialmente por que sólo observamos una menor eficacia de metilfenidato (en generar las conductas tipo adictivas) en ratas tratadas con TP. Esto implica que la administración neonatal de TP produciría menores efectos recompensantes a drogas psicoestimulantes, debido a la disminución de la expresión de DAT y a una menor liberación de la DA en NAcc inducida por metilfenidato.

9) 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] Gorski RA. Influence of age on the response to paranatal administration of a low dose of androgen. Endocrinology 1968; 82: 1001-1004.

[4] 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. Fertility and sterility 2011; 96: 1490-1496.

[5] Cruz G, Riquelme R, Espinosa P, Jara P, Dagnino-Subiabre A, Renard GM *et al.* Neonatal exposure to estradiol valerate increases dopamine content in nigrostriatal pathway during adulthood in the rat. Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme 2014; 46: 322-327.

[6] Espinosa P, Silva RA, Sanguinetti NK, Venegas FC, Riquelme R, Gonzalez LF *et al.* Programming of Dopaminergic Neurons by Neonatal Sex Hormone Exposure: Effects on Dopamine Content and Tyrosine Hydroxylase Expression in Adult Male Rats. Neural plasticity 2016; 2016: 4569785.

[7] Noori HR, Spanagel R, Hansson AC. Neurocircuitry for modeling drug effects. Addiction biology 2012; 17: 827-864.

[8] Pfaus JG, Damsma G, Nomikos GG, Wenkstern DG, Blaha CD, Phillips AG *et al.* Sexual behavior enhances central dopamine transmission in the male rat. Brain Res 1990; 530: 345-348.

[9] 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. J Neurosci 1997; 17: 851-861.

[10] Morikawa H, Paladini CA. Dynamic regulation of midbrain dopamine neuron activity: intrinsic, synaptic, and plasticity mechanisms. Neuroscience 2011; 198: 95-111.

[11] Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. Neuropsychopharmacology 2010; 35: 217-238.

[12] Wise RA. Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. Neuron 2002; 36: 229-240.

[13] 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.

[14] Hall JE. "Guyton y Hall Tratado de Fisiología Médica" Barcelona: Elsevier España, S.L.; 2011.

[15] McEwen B. Estrogen actions throughout the brain. Recent Prog Horm Res 2002; 57: 357-384.

[16] Creutz LM, Kritzer MF. Mesostriatal and mesolimbic projections of midbrain neurons immunoreactive for estrogen receptor beta or androgen receptors in rats. The Journal of comparative neurology 2004; 476: 348-362.

[17] Johnson ML, Ho CC, Day AE, Walker QD, Francis R, Kuhn CM. Oestrogen receptors enhance dopamine neurone survival in rat midbrain. Journal of neuroendocrinology 2010; 22: 226-237.

[18] Chavez C, Hollaus M, Scarr E, Pavey G, Gogos A, van den Buuse M. The effect of estrogen on dopamine and serotonin receptor and transporter levels in the brain: an autoradiography study. Brain Res 2010; 1321: 51-59.

[19] O'Brien CP, Gardner EL. Critical assessment of how to study addiction and its treatment: human and non-human animal models. Pharmacol Ther 2005; 108: 18-58.

[20] Kalivas PW, Peters J, Knackstedt L. Animal models and brain circuits in drug addiction. Molecular interventions 2006; 6: 339-344.

[21] Steketee JD, Kalivas PW. Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. Pharmacological reviews 2011; 63: 348-365.

[22] Katz RJ, Gormezano G. A rapid and inexpensive technique for assessing the reinforcing effects of opiate drugs. Pharmacology, biochemistry, and behavior 1979; 11: 231-233.

[23] Tzschentke TM. Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. Prog Neurobiol 1998; 56: 613-672.

[24] 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.

[25] Segarra AC, Agosto-Rivera JL, Febo M, Lugo-Escobar N, Menendez-Delmestre R, Puig-Ramos A *et al.* Estradiol: a key biological substrate mediating the response to cocaine in female rats. Horm Behav 2010; 58: 33-43.

[26] Lynch WJ, Carroll ME. Sex differences in the acquisition of intravenously self-administered cocaine and heroin in rats. Psychopharmacology 1999; 144: 77-82.

[27] Kerstetter KA, Ballis MA, Duffin-Lutgen S, Carr AE, Behrens AM, Kippin TE. Sex differences in selecting between food and cocaine reinforcement are mediated by estrogen. Neuropsychopharmacology 2012; 37: 2605-2614.

[28] Lynch WJ, Roth ME, Mickelberg JL, Carroll ME. Role of estrogen in the acquisition of intravenously self-administered cocaine in female rats. Pharmacol Biochem Behav 2001; 68: 641-646.

[29] Garland EJ. Pharmacotherapy of adolescent attention deficit hyperactivity disorder: challenges, choices and caveats. Journal of psychopharmacology 1998; 12: 385-395.

[30] Rothman RB, Baumann MH. Monoamine transporters and psychostimulant drugs. European journal of pharmacology 2003; 479: 23-40.

[31] Cummins ED, Griffin SB, Burgess KC, Peterson DJ, Watson BD, Buendia MA *et al.* Methylphenidate place conditioning in adolescent rats: an analysis of sex differences and the dopamine transporter. Behav Brain Res 2013; 257: 215-223.

[32] 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.

[33] Sotomayor-Zarate R, Quiroz G, Araya KA, Abarca J, Ibanez MR, Montecinos A *et al.* 4-Methylthioamphetamine increases dopamine in the rat striatum and has rewarding effects in vivo. Basic & clinical pharmacology & toxicology 2012; 111: 371-379.

[34] McEwen BS, Alves SE. Estrogen actions in the central nervous system. Endocrine reviews 1999; 20: 279-307.

[35] Woolley CS, McEwen BS. Estradiol regulates hippocampal dendritic spine density via an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism. J Neurosci 1994; 14: 7680-7687.
[36] Cruz G, Riquelme R, Espinosa P, Jara P, Dagnino-Subiabre A, Renard GM *et al.* Neonatal exposure to estradiol valerate increases dopamine content in nigrostriatal pathway during adulthood in the rat. Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme 2014; 46: 322-327.
[37] 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.
[38] Espinosa P. La administración neonatal de testosterona propionato y dihidrotestosterona afecta la neurotransmisión dopaminérgica de la rata hembra y macho adulta. Implicancias en el desarrollo de la conducta adictiva. Instituto de Fisiología: Universidad de Valparaíso; 2014. p. 77.
[39] Sanguinetti N. La administración neonatal de estradiol valerato y testosterona propionato afecta la conducta de preferencia de lugar condicionada a anfetamina en la rata adulta: Implicancias en el desarrollo de la conducta adictiva. Instituto de Fisiología: Universidad de Valparaíso; 2015. p. 61.
[40] Sulzer D, Sonders MS, Poulsen NW, Galli A. Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. Prog Neurobiol 2005; 75: 406-433.
[41] Cummings JA, Jagannathan L, Jackson LR, Becker JB. Sex differences in the effects of estradiol in the nucleus accumbens and striatum on the response to cocaine: neurochemistry and behavior. Drug Alcohol Depend 2014; 135: 22-28.
[42] Becker JB, Ramirez VD. Sex differences in the amphetamine stimulated release of catecholamines from rat striatal tissue in vitro. Brain Res 1981; 204: 361-372.
[43] Mello NK, Knudson IM, Kelly M, Fivel PA, Mendelson JH. Effects of progesterone and testosterone on cocaine self-administration and cocaine discrimination by female rhesus monkeys. Neuropsychopharmacology 2011; 36: 2187-2199.
[44] Purves-Tyson TD, Handelsman DJ, Double KL, Owens SJ, Bustamante S, Weickert CS. Testosterone regulation of sex steroid-related mRNAs and dopamine-related mRNAs in adolescent male rat substantia nigra. BMC neuroscience 2012; 13: 95.
[45] Cao J, Dorris DM, Meitzen J. Neonatal Masculinization Blocks Increased Excitatory Synaptic Input in Female Rat Nucleus Accumbens Core. Endocrinology 2016; 157: 3181-3196.
[46] Venkataraman S, Claussen C, Dafny N. D1 and D2 specific dopamine antagonist modulate the caudate nucleus neuronal responses to chronic methylphenidate exposure. J Neural Transm (Vienna) 2016.
[47] Diaz-Corrales FJ, Miyazaki I, Asanuma M, Ruano D, Rios RM. Centrosomal aggregates and Golgi fragmentation disrupt vesicular trafficking of DAT. Neurobiology of aging 2012; 33: 2462-2477.