



**FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MENCION NEUROCIENCIA**

**MODULACIÓN DE LA RECAPTACIÓN DE DOPAMINA Y DE LA ACTIVACIÓN
DEL RECEPTOR DOPAMINÉRGICO TIPO 1 EN NÚCLEO ACCUMBENS DE RATAS
ADULTAS EXPUESTAS DURANTE LAS PRIMERAS HORAS DE VIDA A
HORMONAS SEXUALES**

MAXIMILIANO ELGUETA REYES

Tesis para optar al grado de

Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencia

Director de Tesis:

**PROF. DR. RAMÓN SOTOMAYOR ZÁRATE
(Universidad de Valparaíso)**

Co-Director de Tesis:

**PROF. DRA. GEORGINA M. RENARD
(Universidad de Santiago de Chile)**

2020

Dedicada

Dedicada a quienes siempre me apoyan y alegran por cada una de mis metas alcanzadas,
mis padres, Jaime y Clara.

Agradecer además a quienes no solo hicieron que todo este proceso fuese más grato, sino que, de un modo u otro, aportaron para llegar al final de este viaje, mis compañeras de laboratorio Camila, Karina, Daniela, Milo, Victoria y Vicky, de quienes estaré por siempre en deuda.

También, a todos mis amigos, de la universidad, del trabajo y de la vida, que pesar de soportar mi lejanía y sufrir las consecuencias de mi estrés, me apoyaron incondicionalmente, muy en especial a Inés y Jorge.

Mención especial a mi tío Luis López, de quién estaré por siempre agradecido por permitirme alojar en su casa, además de brindarme todas las comodidades posibles para poder realizar el desafío de estudiar en otra Región.

Por último, a mis profesores tutores Ramón y Georgina, quienes tuvieron siempre la mejor disposición de ayudarme y enseñarme, junto con tenerme paciencia.

Agradecimientos

El desarrollo de esta tesis ha sido posible gracias al financiamiento obtenido por el **Proyecto FONDECYT N° 116-0398** del Dr. Ramón Sotomayor-Zárate.

Los resultados de esta tesis han sido presentados en los siguientes congresos:

- XL Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Santa Cruz, Región de O'Higgins, Chile.
- XLI Congreso Anual Sociedad De Farmacología De Chile, Región del Bío-Bío, Concepción, Chile.

Índice

1.	Resumen	6
2.	Abstract.....	7
3.	Introducción	9
3.1	Adicción y recompensa	9
3.2	Circuito Dopaminérgico de la Recompensa.....	11
3.3	Modulación del sistema de recompensa	15
3.4	Hormonas Sexuales: Expresión de receptores en el SNC y efectos neurobiológicos sobre circuitos dopaminérgicos	16
3.5	Reprogramación Neonatal con Hormonas Sexuales	17
4.	Hipótesis	20
5.	Objetivos.....	21
5.1	Objetivo General.....	21
5.2	Objetivos Específicos.	21
6.	Materiales y Métodos	22
6.1	Reactivos.....	22
6.2	Animales.....	22
6.3	Administración de las Hormonas Sexuales	23
6.4	Registro de Peso.....	23
6.5	Registro de la Etapa del Ciclo Estral	23
6.6	Microdiálisis cerebral <i>in vivo</i>	24
6.6.1	Preparación de los animales.....	24
6.6.2	Cirugía para implantación de cánula.....	24
6.6.3	Procedimiento de recolección de muestras de dializados cerebrales.....	24
6.6.4	Verificación de postura de cánula de microdiálisis	25
6.7	Determinación de neurotransmisores en dializado	26
6.7.1	Determinación de DA por HPLC-EC.....	26
6.7.2	Determinación de GLU y GABA por HPLC-FL.....	27
6.8	Eutanasia de animales y extracción de órganos.....	28
6.9	Análisis estadístico	28
7.	Resultados	30
7.1	Estudios neuroquímicos en NAcc modulando el receptor D ₁ a través de microdiálisis cerebral reversa.....	30
7.1.1	Niveles extracelulares de DA, GLU y GABA en NAcc (basales y estimulados por SKF-38393) en ratas hembra adultas expuestas neonatalmente a una sola dosis de EV.....	30
7.1.2	Niveles extracelulares de DA, GLU y GABA en NAcc (basales y estimulados por SKF-38393) en ratas macho adultas expuestas neonatalmente a una sola dosis de EV	32
7.2	Estudios neuroquímicos en NAcc modulando DAT a través de microdiálisis cerebral <i>in vivo</i>	35

7.2.1	Niveles extracelulares de DA, GLU y GABA en NAcc (basales y estimulados por MPD) en ratas hembra adultas expuestas neonatalmente a una sola dosis de EV.	35
7.2.2	Niveles extracelulares de DA, GLU y GABA en NAcc (basales y estimulados por MPD) en ratas macho adultas expuestas neonatalmente a una sola dosis de EV.	37
8.	Discusión	40
8.1	<i>Efectos de la reprogramación neonatal con estradiol valerato sobre la liberación de DA, GLU y GABA en NAcc, inducida por activación del receptor D₁ en ratas adultas de ambos sexos.</i>	40
8.2	<i>Efectos de la reprogramación neonatal con hormonas sexuales sobre la liberación de DA, GLU y GABA en NAcc, inducida por el bloqueo de DAT en ratas adultas de ambos sexos.</i>	43
9.	Conclusiones	46
10.	Bibliografía	47
11.	Anexos	55
11.1	Caracterización del modelo de estrogenización neonatal: Curvas de peso y parámetros de función reproductiva.	55
11.1.1	Curvas de Peso	55
11.1.1	Peso de tejidos sensibles a la acción de hormonas sexuales en ratas hembra adultas.	56
11.1.2	Peso de tejidos sensibles a la acción de hormonas sexuales en ratas macho adultos.	57
11.1.2	Efectos sobre la Ciclicidad Estral en Ratas Hembra Controles y Estrogenizadas	59

1. Resumen

Los estudios en la reprogramación neonatal se centran en describir los cambios a largo plazo producidos por los estímulos en las etapas sensibles del desarrollo. En este sentido, se ha demostrado que la administración neonatal de hormonas sexuales tiene un efecto a largo plazo, produciendo un aumento en la liberación y el contenido de dopamina (DA) en áreas como el sistema mesocorticolímbico, un circuito importante en las respuestas de recompensa a drogas de abuso. Los estudios que utilizan este paradigma han demostrado que las ratas hembra tratadas con valerato de estradiol (EV) tienen un aumento en la actividad locomotora inducida por metilfenidato (MPD) menor que las ratas control, fenómeno asociado a una menor expresión del transportador de dopamina (DAT). En este contexto, nuestro grupo de investigación ha propuesto determinar los niveles extracelulares de DA, Glutamato (GLU) y GABA en el núcleo accumbens (NAcc) modulados tanto por el receptor de DA, por medio del agonista D₁ SKF-38393 (30 µM), como por el transportador de DA, usando MPD (5 mg / Kg) en ratas adultas expuestas durante las primeras horas de vida a EV (0.1 mg / 50µLs.c), utilizando la técnica de microdiálisis cerebral.

Nuestros resultados mostraron un aumento porcentual mayor en los niveles extracelulares de DA en NAcc inducidos por SFK-38393 sobre ratas hembra tratadas con EV, en comparación con las ratas control, mientras que los niveles de GABA de hembras y machos EV fueron menores que el grupo control, sin diferencias en los niveles de GLU entre ambos grupos.

Por otro lado, se evidenció que en los grupos tratados con EV y que recibieron una dosis aguda de MPD, los niveles de DA en NAcc fueron menores que los del grupo control, mientras que los de GABA fueron más altos en el grupo EV, sin mostrar diferencias en los niveles de GLU.

Estos resultados indican que el modelo de reprogramación neonatal con EV puede estar implicado en cambios a largo plazo de proteínas claves en la neurotransmisión dopaminérgica, afectando la expresión y/o funcionalidad no solo de DAT, conllevando a cambios extracelulares en niveles de DA, sino que también de receptores D₁ localizados en

MSN o de los receptores GABA_B expresados en los terminales dopaminérgicos de NAcc, afectando niveles extracelulares de GABA que podrían estar influyendo de manera inversa en la liberación de DA.

Es por ello que este trabajo de tesis aporta nuevos antecedentes que relacionan el rol de un tono GABAérgico sobre los niveles extracelulares de DA en NAcc, así como también en la modulación ejercida a largo plazo por los estrógenos en períodos críticos del desarrollo sobre circuitos relacionados con la respuesta a drogas de abuso.

2. Abstract

Studies in neonatal reprogramming focus on describing the long-term changes produced by stimuli in the sensitive stages of development. In this sense, neonatal administration of sex hormones has been shown to have a long-term effect, producing an increase in the release and content of dopamine (DA) in areas such as the mesocorticolimbic system, an important circuit in reward responses to drugs of abuse. Studies using this paradigm have shown that female rats treated with estradiol valerate (EV) have a lower increase in locomotor activity induced by methylphenidate (MPD) than control rats, a phenomenon associated with a lower expression of the dopamine transporter (DAT). In this context, our research group has proposed to determine the extracellular levels of DA, Glutamate (GLU) and GABA in the nucleus accumbens (NAcc) modulated both by the DA receptor, by means of the D1 agonist SKF-38393 (30 μ M), as by the DA transporter, using MPD (5 mg / Kg) in adult rats exposed during the first hours of life to EV (0.1 mg / 50 μ Ls.c), using the cerebral microdialysis technique.

Our results showed a greater percentage increase in extracellular levels of DA in NAcc induced by SFK-38393 in female rats treated with EV, compared to control rats, while the GABA levels of female and male EVs were lower than the group control, without differences in GLU levels between both groups.

On the other hand, it was shown that in the groups treated with EV and who received an acute dose of MPD, the levels of DA in NAcc were lower than those in the control group, while those of GABA were higher in the EV group, without show differences in GLU levels.

These results indicate that the neonatal reprogramming model with EV may be involved in long-term changes of key proteins in dopaminergic neurotransmission, affecting the expression and / or functionality not only of DAT, leading to extracellular changes in DA levels, but also of D1 receptors located in MSN or of GABAB receptors expressed in the dopaminergic terminals of NAcc, affecting extracellular levels of GABA that could be inversely influencing the release of DA.

That is why this thesis work provides new background that relates the role of a GABAergic tone on the extracellular levels of DA in NAcc, as well as on the long-term modulation exerted by estrogens in critical periods of development on circuits related to the response to drugs of abuse.

3. Introducción

3.1 Adicción y recompensa

La adicción a drogas de abuso corresponde a un trastorno crónico, caracterizado principalmente por a) la búsqueda y uso compulsivo de la droga, b) la pérdida de control para limitar su ingesta y c) la aparición de un estado emocional negativo (ya sea disforia, ansiedad o irritabilidad), lo que refleja un síndrome de abstinencia motivacional cuando se impide el acceso a esta [1]. Desde una perspectiva diagnóstica, en 2013 el DSM-5 renombró el concepto de adicción como “trastorno por uso de sustancias”, definición que combinó el abuso de sustancias y la dependencia a estas, clasificándolo en rangos que varían entre leve, moderado y grave [2]. A su vez, la adicción se conceptualiza como un ciclo recurrente de tres etapas, que van desde i) el “binge” que corresponden al uso agudo de grandes dosis de las drogas y que pueden llevar a cuadros de intoxicaciones, ii) la abstinencia o efectos reforzantes negativos y iii) “craving” que corresponde a la avidez por consumir la droga [2]. Esta última etapa se caracteriza por un aumento en la frecuencia e intensidad en el tiempo, involucrando cambios neuroplásticos en los sistemas de recompensa, de manejo del estrés y de la función ejecutiva del cerebro, lo que lleva a alteraciones duraderas del comportamiento, como el deseo y la recaída al consumo [2, 3, 4].

Las drogas de abuso tienen como blanco farmacológico vías cerebrales que se denominan conjuntamente como circuito de la recompensa, ejerciendo en un principio, efectos placenteros y de reforzamiento positivo en quienes las consumen [1, 5]. Los recompensantes naturales, como la comida, el sexo, la interacción social, entre otros, que son fundamentales para la sobrevivencia de los individuos, también activan el circuito de la recompensa, produciendo la percepción de placer y de reforzamiento positivo [6, 7, 8, 9]. Solomon y Corbit (1974) postularon que los estados placenteros, afectivos o emocionales, una vez iniciados, son modulados automáticamente por el sistema nervioso central, con mecanismos de retroalimentación negativa que buscan reducir la intensidad de estos estados. Sin embargo, las drogas de abuso usurpan estos sistemas cerebrales, manteniendo una activación circuital de mayor intensidad y duración que la producida por los reforzantes naturales [10].

Todas las drogas de abuso, cuando se administran de forma aguda, disminuyen los umbrales de recompensa de estimulación cerebral (facilitando el alcanzar estados hedónicos), mientras que cuando se administran crónicamente aumentan los umbrales de recompensa durante la abstinencia (dificultando los estados placenteros) por lo que se hace necesario aumentar las dosis y la frecuencia del consumo de la droga [1].

Di Chiara e Imperato (1988), utilizaron distintas drogas de abuso, ya sea opiáceos, etanol, nicotina, anfetamina y cocaína, midiendo las cantidades extracelulares de dopamina (DA) en núcleo accumbens (NAcc) y caudado dorsal, demostrando que todas estas drogas producen un aumento de los niveles extracelulares de DA, aun cuando todas las drogas mencionadas anteriormente tienen distintos mecanismos de acción (ver figura 1) [11]. Todas estas evidencias establecieron que la activación del sistema dopaminérgico mesolímbico contribuye al efecto placentero interoceptivo (recompensa), así como en el efecto locomotor [11].

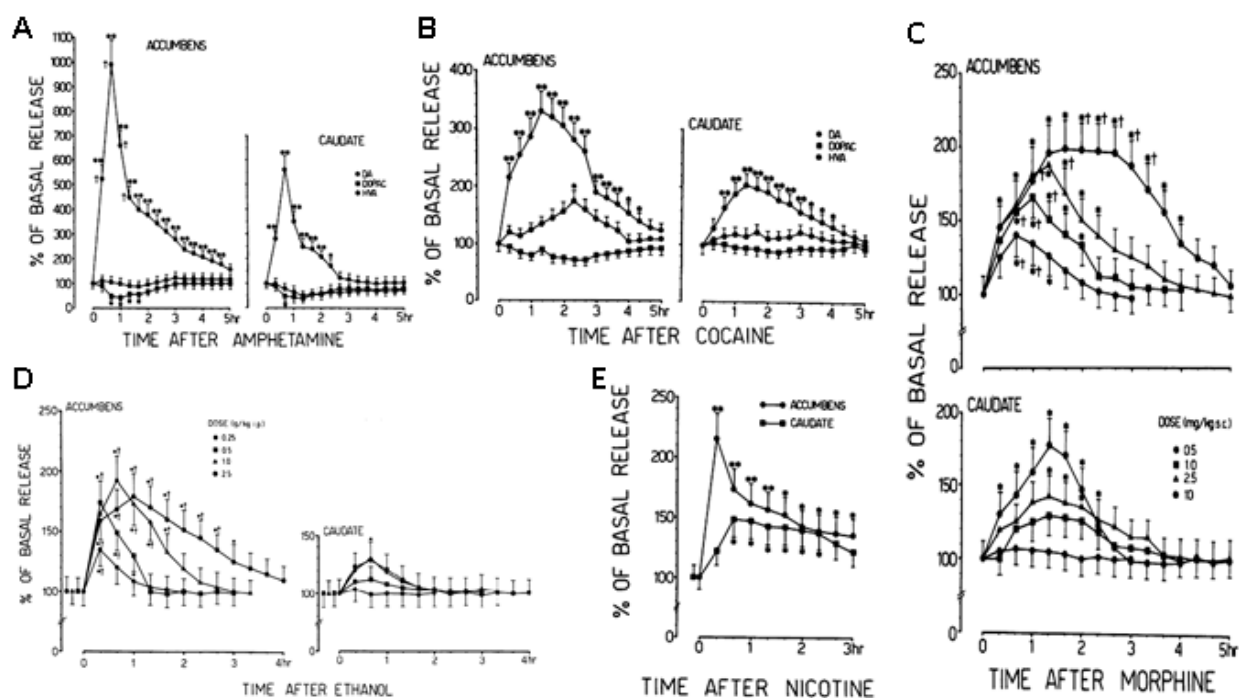


Figura 1. Drogas de abuso y dopamina en NAcc y caudado. Efecto de la anfetamina [1.0 mg / kg (s.c.)], cocaína [5 mg / kg (s.c.)], morfina, etanol y nicotina [0.6 mg / kg (s.c.)] sobre la liberación de dopamina (DA), ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) y ácido homovalínico (HVA) de los accumbens y del caudado, mostrando un aumento. Esquema tomado y modificado de referencia [11].

A nivel celular, el aumento de DA producido por las drogas de abuso se produce por un cambio en la frecuencia de disparo de las neuronas dopaminérgicas de tónico a fásico, con una magnitud mayor a la producida por los reforzantes naturales [12, 13]. De hecho, la señalización dopaminérgica fásica inducida por drogas de abuso puede eventualmente desencadenar neuroadaptaciones en circuitos auxiliares, junto con modular la expresión de genes involucrados en la neuroplasticidad y/o a través de modificaciones epigenéticas que lleven a afectar las cascadas de señalización intracelulares y los circuitos neuronales involucrados en la adicción [12].

3.2 Circuito Dopaminérgico de la Recompensa

La DA es un neurotransmisor del tipo catecolaminérgico, cuya síntesis es realizada en el citoplasma de terminales nerviosos de las neuronas dopaminérgicas, siendo su precursor principal, el aminoácido L-tirosina. Este aminoácido proviene principalmente de la dieta y/o de la hidroxilación de fenilalanina (un aminoácido esencial) por la fenilalanina hidroxilasa. La L-tirosina se hidroxila por medio de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) transformándose en L-DOPA, producto que posteriormente es descarboxilado a DA por la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos o L-DOPA descarboxilasa [14]. La TH es la enzima limitante de la síntesis de DA, y otras catecolaminas como la noradrenalina (NA) y adrenalina (AD). Por lo tanto, la hidroxilación de L-tirosina es el punto de regulación en la síntesis de catecolaminas en el sistema nervioso central (SNC) [15, 16]. En la neurotransmisión dopaminérgica la DA se sintetiza y libera desde dendritas y regiones terminales de los axones [17, 18], lo que lleva a la activación de receptores postsinápticos o presinápticos que regulan su propia liberación (autorreceptores).

Con respecto a los receptores dopaminérgicos, actualmente se sabe que existen al menos seis formas diferentes de estos, los cuales están agrupados en dos familias (D_1 y D_2). La familia de receptores de DA tipo 1 ha sido dividida en los subtipos D_1 y D_5 , mientras que la familia de receptores de DA tipo 2 comprende los subtipos de receptor $D_{2 \text{ short}}$, $D_{2 \text{ long}}$, D_3 y D_4 . Los D_1 y D_2 son los 2 subtipos de receptores más abundantes en el cerebro, siendo D_1 el más ampliamente distribuido y más altamente expresado [19]. Los subtipos de receptores de la familia D_1 estimulan la actividad de la enzima adenilato ciclasa, induciendo la

activación de la proteína quinasa A (PKA), lo que resulta en la fosforilación de sustratos variables y la inducción de la expresión génica temprana inmediata, así como la modulación de numerosos canales iónicos. En cambio, los subtipos de receptores de tipo D_2 inhiben generalmente la actividad de esta (ver figura 2) [17, 19]. Se ha reportado que la afinidad de los receptores tipo D_2 por DA es la mayor de todos los receptores dopaminérgicos, mientras que la afinidad por los receptores D_3 y D_4 es menor que los D_2 , pero mayor a la del D_1 [20]. A su vez, los receptores D_1 y D_2 pueden existir en estados de alta y baja afinidad [19, 21].

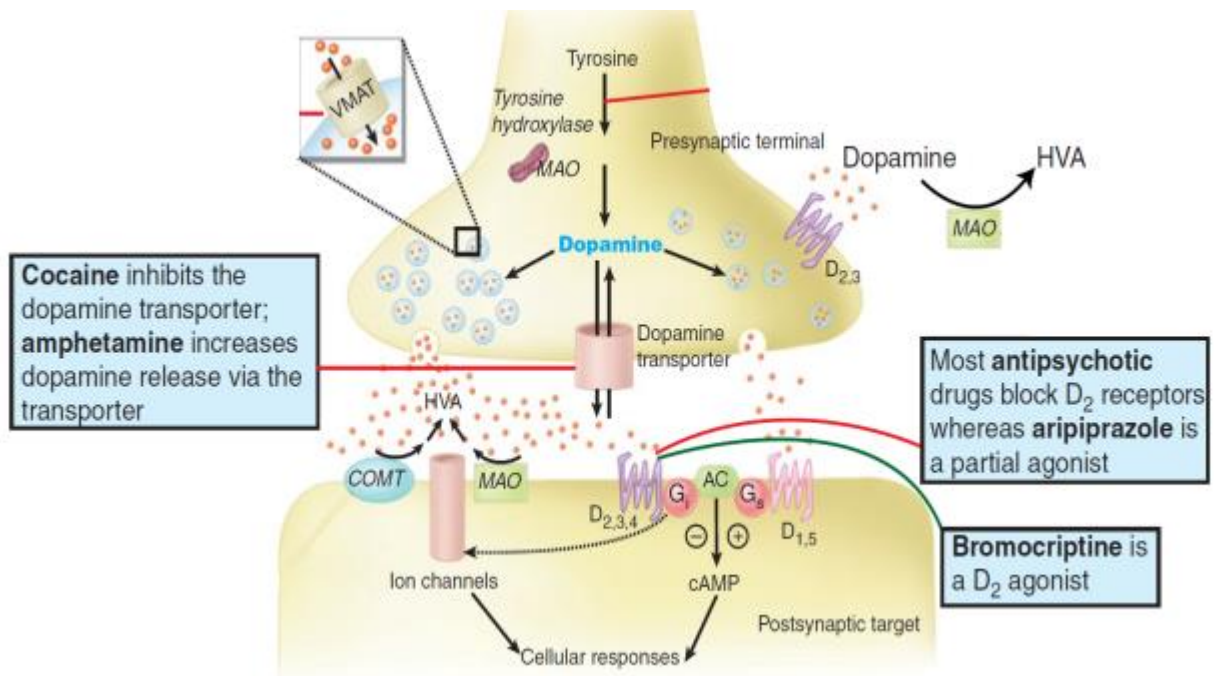


Figura 2. Sinapsis dopaminérgica y su modulación farmacológica. A nivel presináptico, se destaca la síntesis de dopamina, el transportador vesicular (VMAT₂), la presencia de autorreceptores $D_{2/3}$, la ubicación subcelular de la MAO y la COMT, y el transportador de DA. Mientras que en postsináptico están los receptores del tipo 1 y 2 de dopamina con sus respectivas vías de transducción. Como muestran los recuadros insertos en la figura son muchos los fármacos que afectan la biodisponibilidad neuronal de dopamina, siendo aquellos que modifican la función del transportador (ej: cocaína y anfetamina) los más importantes en aumentar los niveles extracelulares de dopamina. Esquema modificado de "Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience" 2^{da} Edición 2009.

La liberación de DA es regulada fisiológicamente por autorreceptores D_2 presentes en el terminal dopaminérgico que pueden inhibir la síntesis y/o liberación de DA [17, 22]. Sin embargo, la proteína más importante en la regulación de los niveles extracelulares de DA es el transportador de DA (DAT) el cual recaptura la DA hacia el terminal, disminuyendo los niveles extracelulares de DA en el espacio sináptico [17]. La DA recaptada puede ser re-almacenada en vesículas o ser metabolizada a ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) por la enzima monoamino-oxidasa (MAO). La isoforma A de la MAO (MAO-A) se encuentra en la mitocondria del terminal, mientras que la isoforma B (MAO-B) está presente en la membrana postsináptica [23]. Otra importante enzima metabolizadora de catecolaminas es la catecol-O-metiltransferasa (COMT), que transforma la DA en 3-metoxitiramina, la cual, al ser metabolizada por la MAO, o el DOPAC por la COMT, producen el principal metabolito en humanos que es el ácido homovalínico (HVA) [23].

En el cerebro adulto, las neuronas dopaminérgicas son un grupo de células anatómica y funcionalmente heterogéneas, localizadas en el bulbo olfatorio, el diencefalo y el mesencefalo, [24, 25], siendo la parte ventral de este último donde residen casi todas las células productoras de DA. En el caso del SNC de rata, existe un número importante de células dopaminérgicas, que bordea las 15.000 a 20.000 por cada una de las mitades del mesencefalo, región donde se encuentran los grupos más importantes de ellas [23, 26].

Mediante técnicas de fluorescencia e inmunocitoquímica, se demostró la existencia de 10 núcleos productores de DA. Estos grupos neuronales han sido denominados desde A8 hasta A17 de acuerdo con la clasificación de Fuxe, elaborada en 1965 [27].

Las neuronas dopaminérgicas y sus proyecciones han sido clasificadas en sistemas cortos, intermedios y largos, destacándose entre estos últimos las neuronas mesodiencefálicas, las que forman un grupo neuronal específico, el cual incluye la sustancia nigra *pars compacta* (SNc), el área tegmental ventral (VTA) y el campo retrorubral (RRF).

Las células dopaminérgicas del VTA que se proyectan principalmente al NAcc, al tubérculo olfatorio, la amígdala y el hipocampo, forman el sistema mesolímbico. Por otro lado, en el sistema mesocortical, las neuronas dopaminérgicas del VTA extienden sus fibras a la corteza prefrontal, cingulada y perirrinal (20). Debido a la superposición entre estos dos

sistemas, a menudo se les conoce colectivamente como el sistema mesocorticolímbico [20, 21].

Este sistema mesocorticolímbico (ver figura 3) es crucial para la recompensa producida por las drogas de abuso [28]. No obstante, otras vías dopaminérgicas, como la vía mesoestriatal (células productoras de DA en sustancia nigra que se proyectan en el estriado dorsal) también contribuyen a la recompensa de drogas y la adicción [23, 24, 28].

En relación al Nacc, esta área no solo recibe proyecciones dopaminérgicas mesolímbicas principalmente desde el VTA, sino también proyecciones glutamatérgicas de múltiples áreas como la amígdala, hipocampo, tálamo y corteza prefrontal [29, 30,]. Además, recibe información GABAérgica por medio de interneuronas locales, conocidas como neuronas espinosas medianas (MSN), las cuales representan aproximadamente un 95% en estriado dorsal y ventral (NAcc) [29].

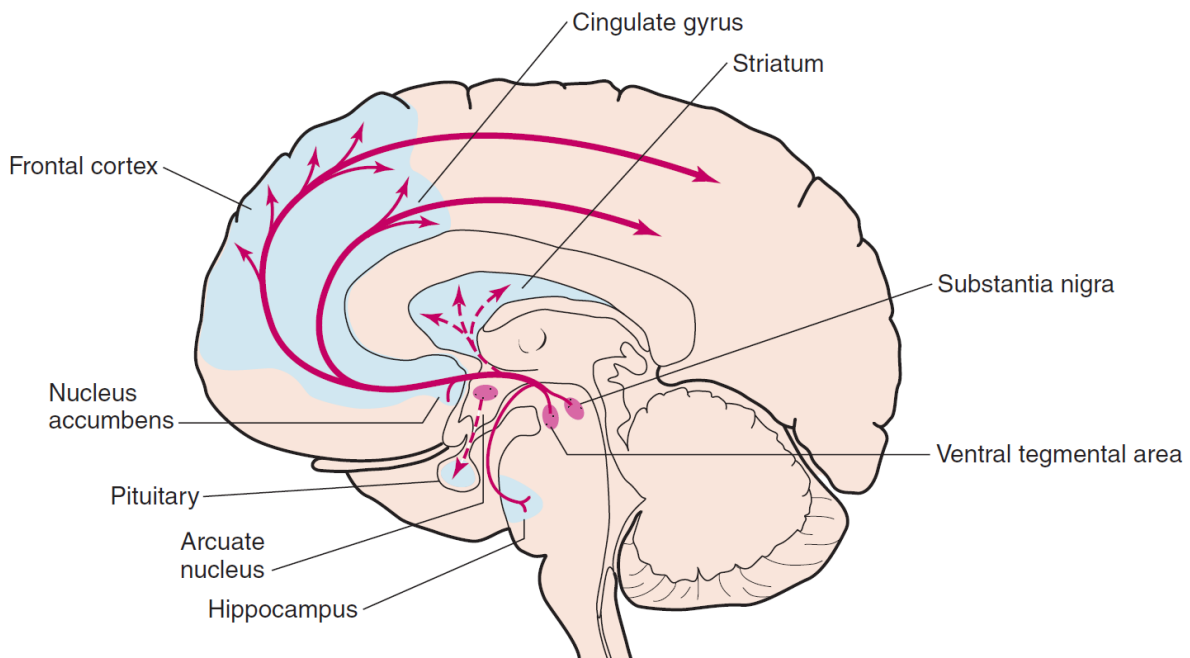


Figura 3. Sistema dopaminérgico y procesamiento de recompensas. Las neuronas dopaminérgicas se encuentran en las estructuras del mesencéfalo, sustancia nigra (SNc) y el área tegmental ventral (VTA). Sus axones se proyectan hacia el cuerpo estriado (núcleo caudado, putamen y cuerpo estriado ventral, incluido el núcleo accumbens), la corteza prefrontal dorsal y ventral. La vía de la dopamina mesolímbica media la recompensa natural o inducida por fármacos. Esquema tomado de “Molecular Neuropharmacology : A Foundation for Clinical Neuroscience” 2^{da} Edición 2009.

3.3 Modulación del sistema de recompensa

A medida que se han estudiado los circuitos asociados a la recompensa por drogas de abuso se ha demostrado la participación de otros neurotransmisores y neuromoduladores que regulan el sistema, tal como péptidos opioides, glutamato (GLU), ácido γ -aminobutírico (GABA), serotonina, acetilcolina y endocannabinoides, entre otros [31]. De hecho, en los terminales dopaminérgicos, la síntesis y liberación de DA es modulada por heteroreceptores como los receptores de adenosina tipo 2 (A_2), N-metil-D-aspartico (NMDA) para GLU y GABA tipo B ($GABA_B$) entre otros que actúan a nivel del VTA o del NAcc [32, 33, 34]. Por otro lado, farmacológicamente se ha demostrado una interacción cooperativa de D_1 y D_2 en la regulación de vías de retroalimentación negativa hacia el VTA y que modulan la actividad de las neuronas dopaminérgicas [35, 36].

Si bien en la literatura existe información sobre el rol de los agonistas y antagonistas de los receptores D_1 y D_2 en la modulación de las propiedades gratificantes y en la autoadministración de drogas de abuso, se piensa que los receptores D_1 juegan un papel más predominante en las propiedades de recompensa [37]. Respecto a esto, usando autoestimulación intracraneal se ha demostrado que tanto antagonistas como agonistas parciales de D_1 , reducen la recompensa por estimulación cerebral [38], mientras que los agonistas totales de este receptor la facilitan [39]. En estudios de autoadministración de drogas, la utilización de SCH-23390 (antagonista D_1) produjo una disminución en la autoadministración de metanfetamina [40], junto con un aumento en la ingesta de cocaína, la que es revertida en altas dosis de este antagonista [41].

Por otro lado, mediante inyecciones intracraneales de SCH-23390 en el NAcc, se observó tanto una disminución en la autoadministración de cocaína [42,43], como también un bloqueo en la adquisición de CPP para esta droga [44, 45]. A su vez, la administración subcutánea de este antagonista altera los programas de reforzamiento, mostrándose una disminución en la autoadministración de nicotina y cocaína [46, 47], evidenciando con estos antecedentes, que los antagonistas para D_1 reducen los efectos gratificantes de los psicoestimulantes.

No obstante, inyecciones sistémicas del agonista parcial SKF-38393 produjeron aversión de lugar condicionado (CPA), siendo contrarrestado por un antagonista [48], mientras que las microinyecciones intra-NAcc de este agonista parcial sí provocó CPP [49]. Inyecciones sistémicas con otros agonistas para D₁, tal como SKF-81297, SKF-82958 y ABT-431 son capaces de producir CPP de manera dosis-dependiente, mientras que A-77636, también agonista D₁, genera CPA [50].

Con estos antecedentes, se es importante destacar que el papel de los receptores de DA en el abuso de drogas es complejo, pues los resultados difieren entre sí, ya que varían dependiendo del tipo de agonista utilizado, del tipo de administración (sistémica o perfundida en una región específica del cerebro) y hasta del día post natal de las ratas al momento del tratamiento [37].

3.4 Hormonas Sexuales: Expresión de receptores en el SNC y efectos neurobiológicos sobre circuitos dopaminérgicos

Las hormonas sexuales son moléculas de carácter lipofílico, producidas principalmente por las gónadas y que ejercen su función en tejidos reproductivos y no reproductivos, a través de receptores expresados principalmente a nivel intracelular [51]. Además, producen importantes efectos neurofisiológicos a nivel del SNC, debido a que cruzan la barrera hematoencefálica. Simerly *et al.* [52], describieron en detalle la distribución del ARNm para receptores de estrógenos (ERs) y andrógenos (AR) en neuronas del cerebro de rata, utilizando inmunohistoquímica e hibridación *in situ*. Entre sus hallazgos encontraron que las células que contienen ARNm de ERs y AR están ampliamente distribuidas por todo el cerebro de la rata, incluyendo regiones como el hipotálamo lateral, núcleos talámicos intralaminares y capas profundas de la corteza cerebral, entre otras [52]. Posteriormente, gracias a los estudios realizados por Shughrue *et al.* [53], se comparó la distribución del ARNm de las isoformas de los ERs alfa (ER- α) y beta (ER- β) en cerebro de rata, encontrando que la expresión de los ARNm se encuentra en toda la extensión rostral-caudal del cerebro, y también en áreas importantes de la recompensa como lo es el VTA [53]. Del mismo modo, se evidenció la existencia de sitios de unión específica para la

progesterona (P), estrógenos (E) y testosterona (T) en las membranas neuronales, destacando neuronas dopaminérgicas [54, 55].

Respecto a los E y DA, el sistema dopaminérgico nigroestriatal es neuromodulado por el 17β -estradiol (E_2) favoreciendo la liberación de DA estriatal inducida por anfetamina en ratas ovariectomizadas (OVX) [54]. Cabe señalar que E_2 es quien tiene el efecto más potente de los E sobre los ERs debido a su mayor afinidad por estos [56]. Becker *et al.* demostró usando microdiálisis que los niveles de DA estriatal son significativamente más altos en proestro y estro que en el diestro o después de la ovariectomización (OVX) [57]. Este estudio demostró que las hormonas ováricas modulan la actividad dopaminérgica en el sistema nigroestriatal. Además, se ha demostrado que las hormonas sexuales modulan la expresión de proteínas claves para el sistema dopaminérgico como DAT [58, 59, 60], reduciendo su expresión en NAcc de ratas OVX, que es revertido frente al reemplazo hormonal con E_2 [61]. Respecto a los receptores dopaminérgicos, se describió que los niveles del D_2 están significativamente aumentados en NAcc y en cuerpo estriado (CE) de ratas OVX, mientras que el reemplazo hormonal con E_2 reduce los niveles de este receptor a condiciones control [61]. Por otro lado, usando hibridación *in situ* demostró que luego de 14 días de tratamiento con E_2 , existe una disminución en la expresión de mRNA de D_2 en CE y NAcc [62]. Finalmente, se ha demostrado que los estrógenos también pueden actuar sobre receptores de membrana acoplados a proteína G (GPER) regulando diversos procesos neurofisiológicos rápidos e independientes de la expresión génica [63].

3.5 Reprogramación Neonatal con Hormonas Sexuales

En 1991, Lucas definió el concepto de *programming* o reprogramación como "la reorientación fisiológica de un tejido u órgano por un estímulo, en un período sensible de desarrollo, que produce cambios funcionales adversos en la edad adulta" [64]. Bajo este paradigma y tomando en cuenta el efecto modulador de las hormonas sexuales, es que Raizza *et al.* [65] inyectaron testosterona propionato (TP) el primer día postnatal en ratas de ambos sexos y analizaron los niveles de inmunoreactividad (IR) celular para AR y ER en sustancia nigra *pars reculata* (SNpr). Las ratas hembra tratadas con TP tuvieron niveles más bajos de IR para AR y ER β que los controles, mientras que no hubo diferencias en los

niveles de IR para ER- α . Posteriormente se logró determinar que las neuronas que presentan IR para ER- β , envían proyecciones colaterales al caudado-putamen ventral y a la amígdala principalmente, mientras que las neuronas IR para AR proyectan a la amígdala y al NAcc [66]. Por otro lado, se determinó que en ratas OVX hubo una reducción en el número de células IR para TH en SNpc y VTA, mientras que el reemplazo con E₂ o agonistas de ERs selectivos, como propil-pirazol-triol (PPT) para ER- α o diarilpropionitrilo (DPN) para ER- β durante 1 mes después de la OVX, previno la reducción en la IR para TH en SNpc y VTA [67]. Junto a esto, Khasnavis et al. (2013) mostraron que ratones castrados en el día postnatal (PND) 28-35 tenían un mes después una disminución de la expresión de TH en SN [68].

Respecto a la exposición postnatal temprana a hormonas sexuales, se demostró que la administración neonatal de EV y TP aumentan el contenido de DA y NA en hipotálamo ventromedial [69]. Además, en 2014 Sotomayor-Zárate et al. observaron que la administración neonatal de EV aumenta el contenido de DA y NA en SN y VTA de ratas hembra adultas, demostrando que áreas de biosíntesis catecolaminérgicas aumentan significativamente su contenido de neurotransmisores [69, 70, 71]. Este aumento en el contenido de catecolaminas en las áreas antes señaladas se debió a un aumento en la expresión de la TH enzima limitante en síntesis de catecolaminas. En concordancia, demostraron que efectivamente el aumento en el contenido de DA en VTA y SN de animales adultos tratados durante las primeras horas de vida postnatal con EV se debe a un aumento en la expresión del ARNm y la proteína TH en VTA y SN de ratas adultas de ambos sexos [72, 73]. Este mecanismo que aumenta la expresión de TH depende de un efecto estrogénico directo mediado por EV y la activación de sus receptores, o indirecto por TP, ya que la administración de un andrógeno no aromatizable como dihidrotestosterona (DHT) no afectó la expresión de TH [73]. Interesantemente, no sólo el contenido de DA estuvo aumentado en ratas EV y TP, sino también la liberación de DA en NAcc inducida por un estímulo despolarizante [72, 73]. A nivel conductual, este grupo demostró que en ratas hembras adultas tratadas neonatalmente con TP tienen una menor actividad locomotora inducida por metilfenidato en comparación con ratas hembras adultas control y ratas hembras EV. Esta reducción en la actividad locomotora se relacionó

con una expresión de DAT más baja en el NAcc de ratas TP, lo que redujo el efecto farmacológico de metilfenidato sobre la actividad locomotora [74]. Electrofisiológicamente, usando este mismo protocolo de programación neonatal con hormonas sexuales, se demostró que la frecuencia de corrientes postsinápticas excitatorias espontáneas es significativamente mayor en neuronas espinales medias de NAcc de ratas tratadas con EV, que se relaciona a un alto porcentaje de condicionamiento a morfina en ratas EV respecto a ratas control [72].

En resumen, para el planteamiento de la hipótesis y objetivos de esta tesis es necesario recordar lo siguiente:

- El sistema de la recompensa es fundamental para la supervivencia de las especies y es activado por reforzantes naturales y por drogas de abuso. Sin embargo, la magnitud de esta activación es mucho mayor por drogas altamente adictivas.
- El sistema de la recompensa y otras áreas cerebrales expresan receptores para distintos neuromoduladores como lo son las hormonas sexuales.
- Las hormonas sexuales afectan proteínas claves para la neurotransmisión dopaminérgica, como enzimas de síntesis, de transporte y receptores pre y postsinápticos.

4. Hipótesis

Según los antecedentes señalados anteriormente respecto a los efectos de las hormonas sexuales, específicamente los estrógenos sobre los sistemas dopaminérgicos, nació la pregunta de investigación de esta tesis asociada a ¿la exposición neonatal a EV afecta la liberación de dopamina y de otros neurotransmisores, como GLU y GABA en NAcc de ratas adultas de ambos sexos expuestas a drogas que modulan el DAT y el D₁? Con esta pregunta de investigación planteamos la siguiente hipótesis experimental:

“La administración neonatal de EV disminuye el efecto farmacológico de metilfenidato (un bloqueador de DAT) en Núcleo Accumbens, mientras que la activación del receptor D₁ por SKF-38393 (un agonista D₁) produce menores niveles extracelulares de GLU y GABA en animales EV respecto a animales control”.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General.

Determinar los niveles extracelulares de DA, GLU y GABA en NAcc modulados por la inhibición de DAT y la activación de D₁ en ratas adultas de ambos sexos, expuestas durante las primeras horas de vida postnatal a una sola dosis de EV.

5.2 Objetivos Específicos.

- Determinar los niveles extracelulares de DA inducidos por metilfenidato (i.p.) y SKF-38393 (por microdiálisis reversa) en NAcc de ratas adultas de ambos sexos expuestas durante las primeras horas de vida postnatal a EV, usando microdiálisis cerebral *in vivo* acoplada a detección electroquímica (HPLC-EC).
- Determinar los niveles extracelulares de GLU y GABA inducidos por metilfenidato y SKF-38393 en NAcc de ratas adultas de ambos sexos expuestas durante las primeras horas de vida postnatal a EV, usando microdiálisis cerebral *in vivo* acoplada a detección fluorométrica (HPLC-FL).

6. Materiales y Métodos

6.1 Reactivos

Los reactivos EV, aceite de sésamo, estándar de DA y DOPAC fueron adquiridos en Sigma & Aldrich (St. Louis, MO, USA). SKF-38393 (agonista D₁) fue adquirido en Tocris Bioscience a través de su representación en Chile por la empresa Gene X-Press. Metilfenidato clorhidrato fue donado por Laboratorios Andrómaco S.A. (Peñalolén, Santiago, Chile) al Dr. Miguel Reyes-Parada. Todos los otros reactivos utilizados fueron de grado analítico y/o cromatográfico.

6.2 Animales

Se utilizaron 32 ratas Sprague-Dawley de ambos sexos, provenientes de camadas de animales que fueron adquiridos en los Bioterios de la Universidad de Valparaíso y Pontificia Universidad Católica de Chile, dependiendo de la disponibilidad de animales. Las madres preñadas fueron alojadas en una sala de mantención del Instituto de Fisiología (Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso), bajo condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), humedad ($54 \pm 5 \%$) y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas (encendiendo las luces a las 08:00 am). Además, las hembras preñadas, así como las crías destetadas al PND 21 fueron mantenidas en condiciones de agua y comida (Prolab RMH 3000) *ad libitum*. A contar del PND 21 y hasta el PND 60 los animales fueron agrupados por sexo y por condición experimental (control y EV), procurando no mantener más de 5 animales por caja. Cabe destacar que el tamaño muestral, correspondiendo al número de animales por grupo, fue calculado para obtener una potencia estadística del 90% y un nivel de alfa de $P= 0,05$, obteniendo así 8 animales por grupo experimental. Todos los procedimientos experimentales planteados en esta tesis fueron aprobados por el Comité de Bioética y de Bioseguridad de la Universidad de Valparaíso y otorgados al Proyecto Fondecyt Regular N° 116-0398 cuyo investigador responsable es el Dr. Ramón Sotomayor-Zárate, director de esta tesis de magíster. Adicionalmente, se realizaron todos los esfuerzos para no utilizar más de los animales aprobados por el Comité de Bioética-UV además de evitar su sufrimiento y dolor.

6.3 Administración de las Hormonas Sexuales

Las diferentes camadas de animales fueron asignadas aleatoriamente a los grupos control, y EV. Durante las primeras 12 horas de vida postnatal los animales del grupo control fueron inyectados con 50 μ L de aceite de sésamo (s.c.), mientras que el grupo EV fue inyectado con 0,1 mg de EV disueltos en 50 μ L de aceite de sésamo. Cabe destacar que dicha dosis fue establecida en base a trabajos anteriores [69, 70]. Las ratas neonatas fueron mantenidas con lactancia materna hasta el PND 21, fecha en la cual las crías fueron destetadas y colocadas en cajas de tamaño estándar (16 cm de alto, 26 cm de ancho y 47 cm de largo), procurando separarlas por tratamiento y por sexo.

6.4 Registro de Peso

El registro de peso fue llevado a cabo pesando los animales en balanza granataria desde el PND 1 hasta el 60, excluyendo fines de semana y días feriados. El control de peso permitió observar el crecimiento de las camadas durante todo el tiempo del experimento y una pendiente de peso positiva en esta curva se relacionó con una ganancia de peso normal y con un estado de salud general óptimo.

6.5 Registro de la Etapa del Ciclo Estral

Para las ratas hembras de los grupos control y EV, se registró la etapa del ciclo estral desde el PND 40 hasta el 60-65 (dependiendo si las ratas hembras control de encontraban en etapa estral de diestro). La etapa del ciclo estral se evaluó mediante el análisis de lavados vaginales diarios (lunes a viernes) con un microscopio de luz, comparando las características citológicas que adopta el epitelio vaginal por efecto de los niveles circulantes de hormonas sexuales y que caracterizan a las etapas periovulatorias según las siguientes características:

- *Proestro*: Presencia de células epiteliales nucleadas, bien redondeadas y sólo algunas escamosas de forma irregular (12 a 24 horas).
- *Estro*: Periodo de receptividad sexual por el macho. Presencia de células escamosas (con citoplasma granular), de forma irregular y agrupadas (24 a 48 horas).
- *Metaestro o Diestro 1*: Presencia de leucocitos y células escamosas (12 a 24 horas).

- *Diestro 2*: Etapa con alta presencia de leucocitos en el frotis (48 horas).

Además, el análisis estadístico de los resultados solo comparara animales que se encontraban en la misma etapa estral (generalmente diestro).

6.6 Microdiálisis cerebral *in vivo*

6.6.1 Preparación de los animales

Los animales en los días postnatal 60 a 65 (etapa diestro en hembras), pertenecientes a los grupos control y EV fueron anestesiados con una dosis de 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 estuvo controlada por termostato entre 36-37°C con una manta calefactora eléctrica. La mantención de la anestesia se logró administrando 0,20 a 0,25 del volumen inicial de HC usado para inducir anestesia profunda cada 45 min. Durante todo el curso del experimento fue verificada la sedación y temperatura de los animales.

6.6.2 Cirugía para implantación de cánula

Para estudiar la regulación de los niveles extracelulares DA en NAcc, se realizó experimentos de microdiálisis en ratas anestesiadas según el protocolo descrito anteriormente. Las ratas fueron colocadas en un aparato estereotáxico, en el cual se expuso el cráneo mediante una incisión quirúrgica que permitió determinar el punto bregma de la rata. Respecto a este marcador anatómico se implantó una cánula de microdiálisis de 2 mm de largo (Modelo MAB 2.14.2, 35 kDalton de cut-off, Microbiotech, Suecia) de acuerdo a las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson [75] (anteroposterior: +1,50 mm, mediolateral: +1,5 mm y dorsoventral: -7,8 mm a la superficie del cerebro, respecto al bregma). La cánula de microdiálisis fue perfundida constantemente con líquido cerebrospinal artificial estéril (composición de ACSF en mM: KCl 2,5; NaCl 125; MgCl₂ 1,18; CaCl₂ 1,26). La velocidad de perfusión fue de 2 µL/min usando una bomba de infusión (Modelo RWD 210, RWD Life Science Co. Ltd, China).

6.6.3 Procedimiento de recolección de muestras de dializados cerebrales

Después de implantar la cánula de microdiálisis se dejó un período de estabilización de 90 min antes de comenzar la recolección de muestras de dializado. Una vez finalizado ese tiempo, se tomaron 3 muestras basales de 15 min cada una en 3 µL de ácido perclórico 0,2

N para evitar la oxidación de DA durante el proceso de recolección. Al finalizar la recolección de la tercera muestra basal se siguieron dos protocolos experimentales:

- i) Primero, se perfundió 30 μM de SKF-38393 intra-NAcc usando el protocolo de microdialísis reversa por una ventana de recolección de 15 min, para luego recolectar 6 de dializado post perfusión (ver figura 4).
- ii) Segundo, posterior a la recolección de los 6 dializados post-perfusión de SKF-38393 se volvieron a recolectar 3 dializados basales, para luego inyectar una dosis de metilfenidato (5 mg/Kg [i.p.]) y continuar con la recolección de otras 6 muestras de dializados.

Es importante destacar que las muestras de dializado fueron congeladas a -80°C hasta el día de la cuantificación de neurotransmisores (ver figura 4).

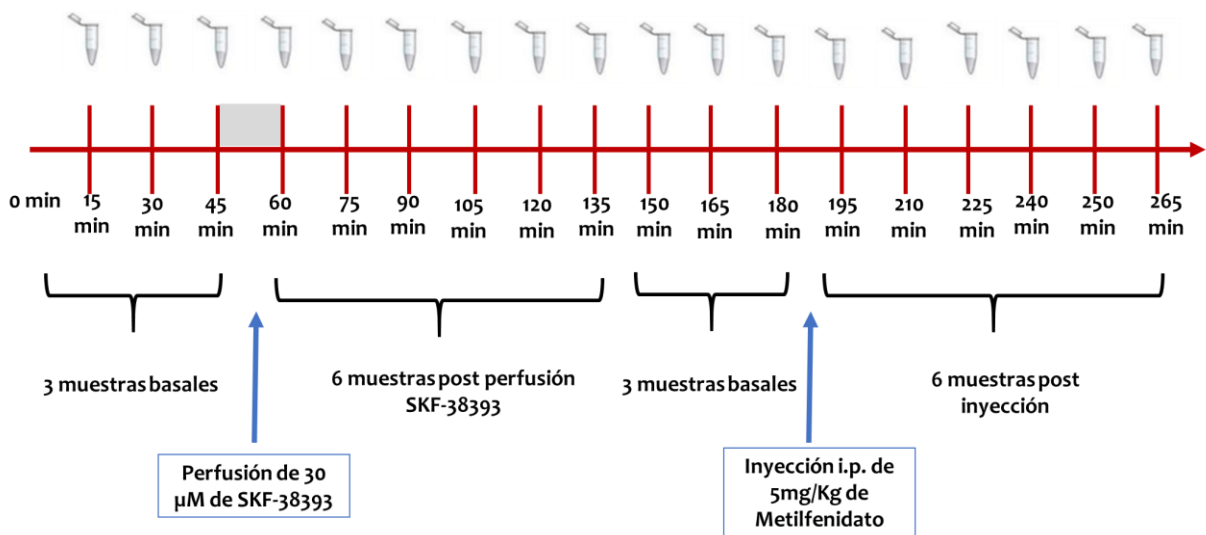


Figura 4. Esquema de protocolo de recolección de dializados cerebrales. Se obtuvieron 3 muestras basales y 6 muestras post perfusión intra-Nacc de SKF-38393 (30 μM , además de 6 muestras post inyección i.p. de Metilfenidato (5 mg/Kg), mediante microdialísis in vivo en NAcc, las muestras se recolectaron en 3 μL de PCA 0.2 N para su preservación y mantenidas a -80°C hasta su análisis.

6.6.4 Verificación de postura de cánula de microdialísis

Al final de cada experimento de microdialísis, las ratas se decapitaron bajo anestesia profunda usando guillotina para animales menores (Stoelting Co., Wood Dale, USA), para luego extraer el cerebro y almacenarlo en paraformaldehído al 4% para posterior análisis

Eka Chemicals AB, Bohus, Suecia) y iii) detector electroquímico configurado a un potencial de oxidación de 650 mV y una sensibilidad eléctrica de 0.5 nA (Modelo LC-4C, BAS, West Lafayette, IN, EUA). La composición estándar de la fase móvil fue la siguiente: 0.1 M de NaH_2PO_4 , 0,625 mM de ácido 1-octanosulfónico, 1 mM de EDTA, 6 % v/v de CH_3CN y 1.0 % v/v de tetrahidrofurano (pH ajustado a 2,4), bombeada a un flujo constante de 0.2 mL/min. Las áreas de los picos de DA en las muestras fueron comparadas con estándares de referencia, que se utilizaron a fin de identificar y calcular las concentraciones de DA, por medio de una curva de calibrado realizada en el programa cromatográfico (Program ChromPass, Jasco Co. Ltd., Tokio, Japón). Bajo estas condiciones, el tiempo de retención para DA fue de 12 min. El fundamento analítico para esta técnica se basa en que las moléculas catecolaminérgicas, bajo las condiciones antes descritas, son oxidadas en el anillo catecol a una ortoquinona, produciendo 2 electrones por cada molécula de DA oxidada (ver figura 6). Estas corrientes oxidativas son directamente proporcionales a la cantidad de moléculas oxidadas de neurotransmisores. Mientras que los tiempos de retención están dados principalmente por la interacción de la cadena alifática con la fase estacionaria de la columna.

6.7.2 Determinación de GLU y GABA por HPLC-FL

La cuantificación de GLU y GABA se realizó usando un HPLC-FL, realizando una derivatización precolumna, usando 20 μL del microdializado, 4 μL de buffer borato (pH 10.8) y 4 μL de reactivo fluorogénico (20 mg de ortoftaldehído y 10 μL de β -mercaptoetanol en 5 mL de etanol absoluto). Para la reacción de derivatización, se mezclaron los reactivos anteriormente señalados, agitando la mezcla por 90 segundos. Finalmente, la mezcla fue inyectada al sistema cromatográfico configurado por i) bomba isocrática (modelo PU-4180, Jasco Co. Ltd., Tokio, Japón), ii) columna de fase reversa C-18 (Kromasil 3-4.6; Suecia) y iii) detector fluorométrico (modelo FP-4025, Jasco Co. Ltd., Tokio, Japón) con una lámpara de Xenón y configurado para medir a longitudes de onda de 350 nm y 450 nm de excitación y emisión, respectivamente (ver figura 6). La fase móvil contenía 0,1 M de NaH_2PO_4 y 24 % v/v de CH_3CN (pH 5,7), bombeada a un flujo de 1 mL/min. El área del pico correspondiente a GLU y GABA se comparó con los estándares de referencia y se calcularon las concentraciones a través de una curva de calibrado realizada con un programa

cromatográfico (ChromNAV 2.0, Jasco Co. Ltd., Tokio, Japón). Se observó un tiempo de retención para GLU de 1.8 min, mientras que para GABA de 13 min.

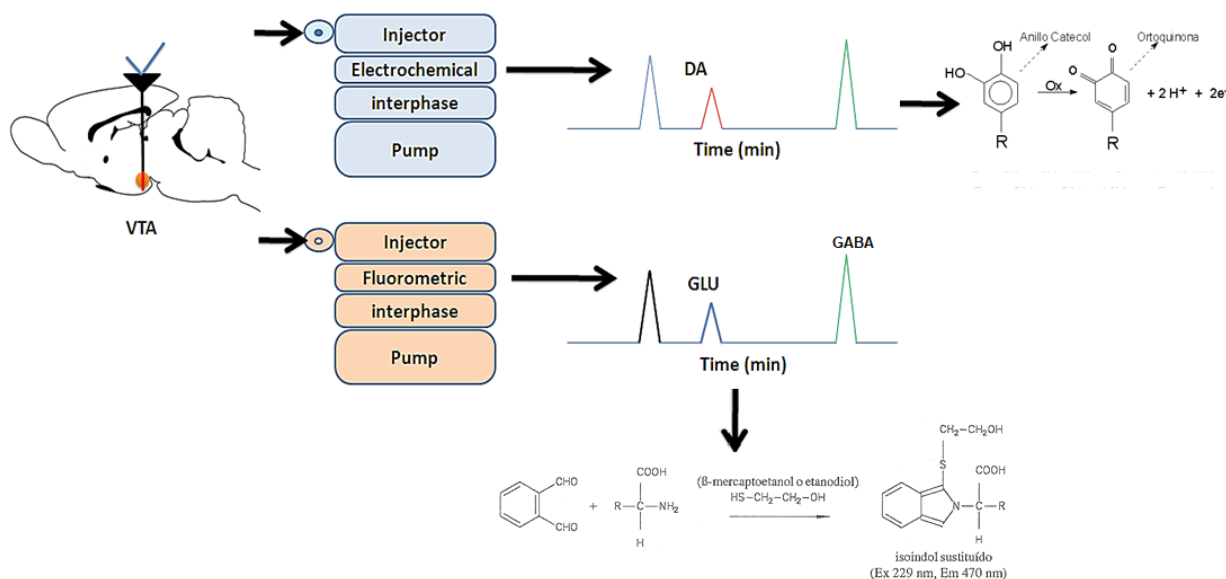


Figura 6. Esquema de la reacción e identificación de los neurotransmisores. El esquema representa la reacción e identificación de los peak de neurotransmisores al ser inyectados en el HPLC-EC (para detección de DA) y HPLC-FL (para detección de GLU y GABA).

6.8 Eutanasia de animales y extracción de órganos

Una vez finalizados los experimentos, los animales fueron eutanasiados por decapitación con guillotina para animales menores y para comprobar el efecto de la administración neonatal de hormonas sexuales, algunos órganos sensibles a la acción de las hormonas fueron pesados en una balanza analítica (Modelo JK-180, Chyo, Japón) y registrados para cada animal. En ratas hembras se extrajeron los ovarios, útero e hipófisis, mientras que en ratas machos se extrajeron los testículos, vesícula seminal e hipófisis. Todos los tejidos fueron comparados con datos previamente publicados por nuestro laboratorio para corroborar que el proceso de inyección neonatal de las hormonas sexuales fue correcto (ver en anexos).

6.9 Análisis estadístico

Los resultados de curso temporal de liberación de DA, GLU y GABA fueron expresados como el valor porcentual promedio para cada tiempo \pm SEM. Cada curva de curso temporal de liberación de los neurotransmisores fue analizada a través de un análisis de varianza de

dos vías (Two-way ANOVA) seguido de un post-test de Fisher's LSD. Este análisis permitió comparar las diferencias estadísticas entre grupos con distinto tratamiento. A su vez, el área bajo la curva (AUC) que los toma en cuenta los valores porcentuales de liberación basal de DA, GLU y GABA, obtenidos desde el comienzo de cada estímulo, fue calculado mediante un análisis de t-test no pareado.

Por otro lado, el peso de tejidos sensibles a hormonas fue expresado como el valor promedio (mg) \pm error estándar medio (SEM). Para analizar las diferencias estadísticas entre tratamientos se utilizó un análisis de varianza de una vía (One-way ANOVA) seguido de un post-test Fisher's LSD. Para los resultados de las curvas de peso entre animales de cada grupo experimental, se utilizó un análisis de varianza de dos vías (Two-way ANOVA) seguido de un post-test Fisher's LSD.

Todos los análisis estadísticos antes mencionados y el diseño de gráficos fueron realizados con el programa GraphPad Prism v8,0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

7. Resultados

7.1 Estudios neuroquímicos en NAcc modulando el receptor D₁ a través de microdiálisis cerebral reversa

7.1.1 Niveles extracelulares de DA, GLU y GABA en NAcc (basales y estimulados por SKF-38393) en ratas hembra adultas expuestas neonatalmente a una sola dosis de EV.

En las figuras 7A, 7C y 7E se observa la liberación de DA, GLU y GABA respectivamente. Entre 0 y 45 min se observa la liberación basal y desde 60 a 135 min la liberación de DA inducida por la perfusión de 30 μ M de SKF-38393 durante 15 min (barra gris desde 45 a 60 min) en ratas hembra adultas control y tratadas neonatalmente con EV. En las figuras 7B, 7D y 7F se observan las áreas bajo la curva (ABC) de los grupos mencionados anteriormente considerando los valores porcentuales de liberación basal de DA, GLU y GABA, respectivamente, desde los 45 a 135 min (obtenidos desde el comienzo de la perfusión con 30 μ M de SKF-38393) y considerando el límite de integración en el eje Y desde 100.

En la figura 7A se observa que los niveles basales de liberación de DA (desde 0 a 45 min) fueron similares en ambos grupos experimentales (RHC: 100,0 \pm 12,0% v/s RHEV: 100,4 \pm 11,0%). Sin embargo, al comparar las curvas temporales de liberación de DA inducida por la perfusión con 30 μ M de SKF-38393 se observa un aumento significativo en la liberación de DA a partir del minuto 45 en las ratas tratadas con EV respecto a las ratas control (60 min ****p < 0,0001; 75 min **p = 0,0091; 90 min *p = 0,0412; 105 min ** p= 0,0018; 120 min ****p < 0,0001 y 135 min **** P <0,0001). El análisis de ANOVA de dos vías seguido del post-test Fisher's LSD para el gráfico 7A, reflejó una interacción [F (8,81) = 4,652; p = 0,0001], tiempo [F (8,81) = 4,737; P < 0,0001] y tratamiento neonatal [F (1,81) = 54,32; p < 0,0001] significativos.

La figura 7B se muestra la comparación del ABC en la liberación de DA obtenida frente a la perfusión con 30 μ M de SKF-38393 en ratas hembra adultas control y EV. En este contexto, el análisis de t-test de datos no pareados de dos vías nos muestra que la ABC para el grupo

EV ($7353 \pm 1333,9$ % liberación basal de DA/90 min) es significativamente mayor que la observada en ratas control ($-760,85 \pm 742,9$ % liberación basal DA/90 min) ($***p= 0,0004$).

En la figura 7C se muestra que la liberación basal de GLU en NAcc no fue diferente entre ambos grupos experimentales (RHC: $100,0 \pm 2,3$ % v/s RHEV: $99,4 \pm 4,7$ %). Además, la liberación de GLU inducida por la perfusión con $30 \mu\text{M}$ de SKF-38393 no arrojó cambios estadísticamente significativos (interacción [F (8,90) = 0,4497; p = 0,8878], tiempo [F (8,90) = 1,910; p = 0,0680] y tratamiento neonatal [F (1,90) = 2,668; p = 0,1059]). Respecto al análisis del ABC (figura 7D) de la liberación porcentual de GLU en 90 min, tampoco se observó una diferencia estadísticamente significativa (RHEV $-1381,7 \pm 890,3$ % v/s RHC $-351,6 \pm 775,9$ %).

En la figura 7E se muestra que no hubo diferencias significativas en la liberación basal de GABA entre ambos grupos experimentales (RHC: $99,7 \pm 4,9$ % v/s RHEV: $99,7 \pm 5,5$ %). El análisis de ANOVA de dos vías seguido del post-test Fisher's LSD solo mostró una diferencia significativa en la liberación de GABA inducida por la perfusión con $30 \mu\text{M}$ de SKF-38393 en el grupo de ratas hembra control a los 75 minutos ($*p = 0,0238$), aunque los factores de interacción [F (8,81) = 1,333; p = 0,2391], tiempo [F (8,81) = 1,859; p = 0,0780] y tratamiento neonatal [F (1,81) = 1,165; p = 0,2836] no fueron estadísticamente significativos. Respecto al análisis del ABC (figura 7F) de la liberación porcentual de GABA en 90 min, tampoco se observó una diferencia estadísticamente significativa (RHEV $67,7 \pm 677,9$ % v/s RHC $1463,7 \pm 609,3$ %).

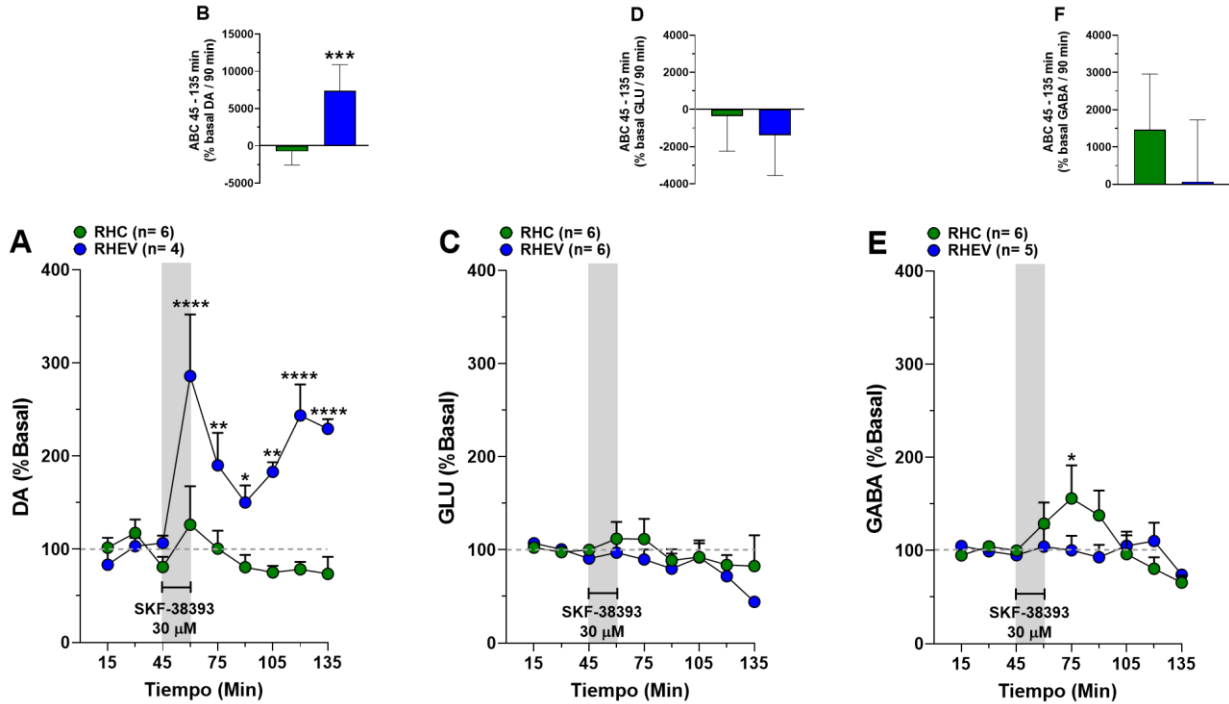


Figura 7. Liberación basal y estimulada de DA, GLU y GABA por SKF-38393 intra NAcc en hembras. La figura representa la liberación basal y estimulada por una dosis intra NAcc de SKF-38393 (30 μ M) al DPN 60-65 de DA, GLU y GABA (A, C y E respectivamente) y cálculo de ABC considerando los valores de porcentaje de liberación basal de DA, GLU y GABA obtenidos desde los 45 a 135 min (90 min total), luego del estímulo con SKF-38393 (B, D y F, respectivamente) en ratas hembra expuestas durante el DPN 1 a aceite de sésamo o EV. El número total de animales utilizados en los grupos experimentales fue de: RHC n=6, RHEV n=6. Los gráficos representan el promedio de % de liberación basal de DA, GLU y GABA \pm error estándar medio. El análisis estadístico para comparar las curvas de curso temporal de liberación de DA, GLU y GABA se realizó utilizando un análisis de varianza two-way ANOVA seguido de un post-test de Fisher's LSD (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001; **** p <0,0001). Para comparar el ABC se utilizó un análisis t-test (* p <0,05).

7.1.2 Niveles extracelulares de DA, GLU y GABA en NAcc (basales y estimulados por SKF-38393) en ratas macho adultas expuestas neonatalmente a una sola dosis de EV

En la figura 8A se muestra que la liberación basal de DA en NAcc no fue diferente entre ambos grupos experimentales (RMC: $99,9 \pm 5,2$ % v/s RMEV: $102,2 \pm 10,1$ %). Además, la liberación de DA inducida por la perfusión con 30 μ M de SKF-38393 solo arrojó cambios estadísticamente significativos en el factor tiempo (tiempo [F (8,90) = 3,565; p = 0,0012], tratamiento neonatal [F (1,90) = 0,9303; p = 0,3374] e interacción [F (8,90) = 0,0966; p = 0,9992]). Respecto al análisis del ABC (figura 8B) de la liberación porcentual de DA en 90 min, tampoco se observó una diferencia estadísticamente significativa (RMEV $6141,6 \pm 3835,9$ % v/s RMC $4817,4 \pm 2974,3$ %).

En la figura 8C se muestra que la liberación basal de GLU en NAcc no fue diferente entre ambos grupos experimentales (RMC: $102,5 \pm 4,1$ % v/s RMEV: $100,1 \pm 4,1$ %). Además, la liberación de GLU inducida por la perfusión con $30 \mu\text{M}$ de SKF-38393 solo arrojó cambios estadísticamente significativos en el factor tratamiento neonatal ([F (1,90) = 6,945; p = 0,0099], no así en interacción [F (8,90) = 1,097; p = 0,3729] ni tiempo [F (8,90) = 1,149; p = 0,3392]). Respecto al análisis del ABC (figura 8D) de la liberación % de GLU en 90 min, tampoco se observó una diferencia estadísticamente significativa (RMEV $816,1 \pm 505,3$ % v/s RMC $-1050,2 \pm 813,0$ %).

En la figura 8E no se observaron diferencias significativas en la liberación basal de GABA entre ambos grupos experimentales (RMC: $100,0 \pm 7,4$ % v/s RMEV: $105,0 \pm 11,6$ %). El análisis de ANOVA de dos vías seguido del post-test Fisher's LSD solo mostró una diferencia significativa en la liberación de GABA inducida por la perfusión con $30 \mu\text{M}$ de SKF-38393 en el grupo de ratas macho control a los 90 minutos (**p = 0,0013) y 135 min (****p < 0,0001), aunque del análisis de los factores solo fueron significativos la interacción entre los grupos y el tratamiento neonatal (interacción [F (8,63) = 4,211; p = 0,0004], tiempo [F (8,63) = 1,175; p = 0,3280] y tratamiento neonatal [F (1,63) = 6,721; p = 0,0118]). Respecto al análisis del ABC (figura 9F) de la liberación porcentual de GABA en 90 min, tampoco se observó una diferencia estadísticamente significativa (RMEV $-1593,9 \pm 1055,1$ % v/s RMC $1092,42 \pm 817,8$ %).

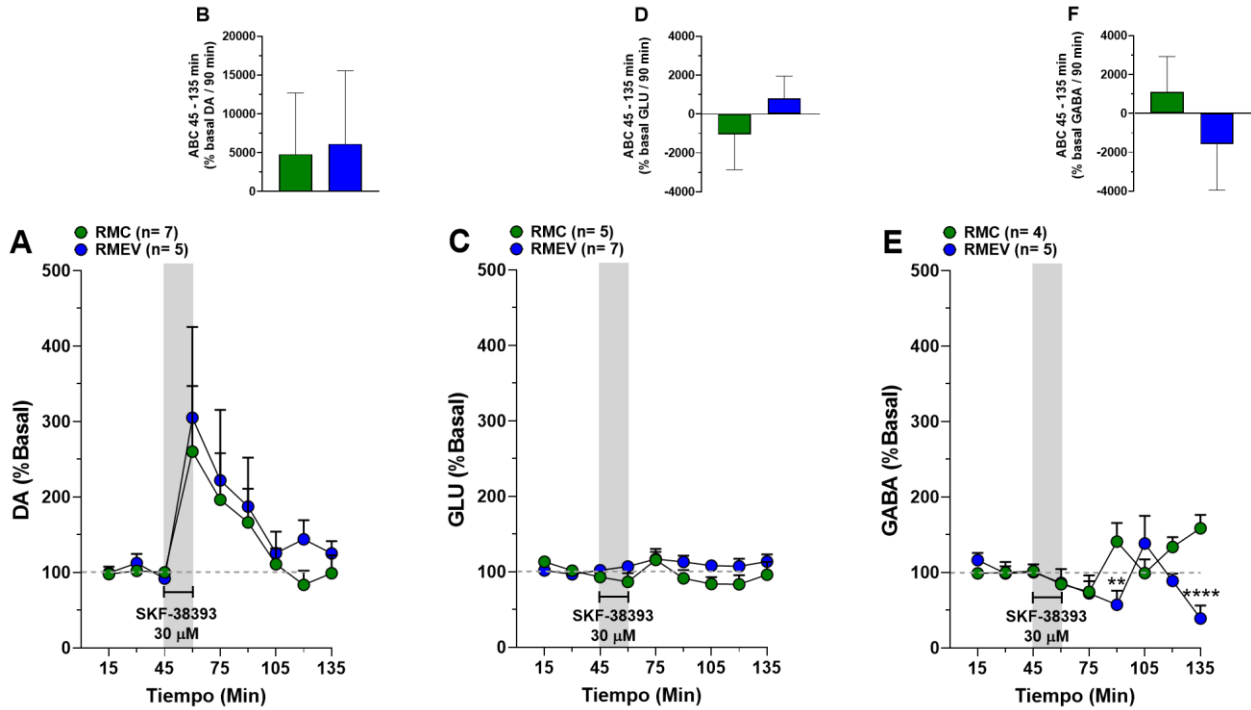


Figura 8. Liberación basal y estimulada de DA, GLU y GABA por SKF-38393 intra NAcc en machos. La figura representa la liberación basal y estimulada por una dosis intra NAcc de SKF-38393 (30 μ M) al DPN 60-65 de DA, GLU y GABA (A, C y E respectivamente) y cálculo de ABC considerando los valores de porcentaje de liberación basal de DA, GLU y GABA obtenidos desde los 45 a 135 min (90 min total), luego del estímulo con SKF-38393 (B, D y F, respectivamente) en ratas macho expuestas durante el DPN 1 a aceite de sésamo o EV. El número total de animales utilizados en los grupos experimentales fue de: RMC n=7, RMEV n=7. Los gráficos representan el promedio de % de liberación basal de DA, GLU y GABA \pm error estándar medio. El análisis estadístico para comparar las curvas de curso temporal de liberación de DA, GLU y GABA se realizó utilizando un análisis de varianza two-way ANOVA seguido de un post-test de Fisher's LSD (*p<0,05; **p<0,01; ****p<0,0001). Para comparar el ABC se utilizó un análisis t-test (*p<0,05).

7.2 Estudios neuroquímicos en NAcc modulando DAT a través de microdialísis cerebral *in vivo*

7.2.1 Niveles extracelulares de DA, GLU y GABA en NAcc (basales y estimulados por MPD) en ratas hembra adultas expuestas neonatalmente a una sola dosis de EV.

En las figuras 9A, 9C y 9E se observa la liberación de DA, GLU y GABA respectivamente. Entre 0 y 45 min se observa la liberación basal y desde 60 a 135 min la liberación de DA inducida por inyección i.p. de 5 mg/kg de MPD justo después de recolectar la tercera muestra basal (flecha negra) en ratas hembra adultas control y tratadas neonatalmente con EV. En las figuras 9B, 9D y 9F se observan las áreas bajo la curva (ABC) de los grupos mencionados anteriormente considerando los valores porcentuales de liberación basal de DA, GLU y GABA, respectivamente, desde los 45 a 135 min (obtenidos desde la inyección i.p. de 5 mg/kg de MPD) y considerando el límite de integración en el eje Y desde 100.

En la figura 9A no se observaron diferencias significativas en la liberación basal de DA entre ambos grupos experimentales (RHC: $100,0 \pm 6,0$ % v/s RHEV: $100,0 \pm 4,9$ %). El análisis de ANOVA de dos vías seguido del post-test Fisher's LSD mostró diferencias significativas en la liberación de DA inducida por la inyección i.p. de 5 mg/kg de MPD en el grupo de ratas hembras control a los 195 (**p = 0,0058), 210 (**p = 0,0003), 225 (**p = 0,0015) y 240 min (*p = 0,0160), mientras que el análisis de los factores fueron significativos la interacción [F (8, 99) = 2,187; P = 0,0347], el tiempo [F (8,99) = 10,94; P < 0,0001] y el tratamiento neonatal [F (1,99) = 27,20; P = 0,0001]. Respecto al análisis del ABC (figura 9B) de la liberación porcentual de DA en 90 min, también se observó una diferencia estadísticamente significativa (**p = 0,0014) (RHEV $2678,2 \pm 632,6$ % v/s RHC $7889,7 \pm 887,3$ %).

En la figura 9C no se observaron diferencias significativas en la liberación basal de GLU entre ambos grupos experimentales (RHC: $99,8 \pm 7,6$ % v/s RHEV: $101,0 \pm 10,2$ %). El análisis de ANOVA de dos vías seguido del post-test Fisher's LSD solo mostró una diferencia significativa en la liberación de GLU inducida por la inyección i.p. de 5 mg/kg de MPD en el grupo de ratas hembra control a los 210 min (**p = 0,0024), aunque del análisis de los

factores solo fue significativo el tiempo [$F(8,81) = 2,823$; $P = 0,0082$] pero no en la interacción [$F(8,81) = 1,593$; $P = 0,1397$] ni en el tratamiento neonatal [$F(1,81) = 0,0043$; $P = 0,9478$]). Respecto al análisis del ABC (figura 11D) de la liberación % de GLU en 90 min, tampoco se observó una diferencia estadísticamente significativa (RHEV $9.685,6 \pm 435,8$ % v/s RHC $10.744,3 \pm 1.157,8$ %).

En la figura 9E no se observaron diferencias significativas en la liberación basal de GABA entre ambos grupos experimentales (RHEV: $-2014,4 \pm 448,5$ % v/s RHC: $-998,1 \pm 1024,3$ %). Del análisis de ANOVA de dos vías seguido del post-test Fisher's LSD solo mostró una diferencia significativa en la liberación de GABA inducida por la inyección i.p. de 5 mg/kg de MPD en el grupo de ratas hembra EV a los 240 min (* $p = 0,0484$), 255 min (** $p = 0,0023$) y 270 min (* $p = 0,0170$), aunque del análisis de los factores solo fue significativo la interacción entre los grupos [$F(8,63) = 2,754$; $P = 0,0113$] y el tratamiento neonatal [$F(1,63) = 4,105$; $P = 0,470$] pero no el tiempo [$F(8,63) = 1,128$; $P = 0,3572$]. Respecto al análisis del ABC (figura 9F) de la liberación porcentual de GABA en 90 min, tampoco se observó una diferencia estadísticamente significativa (RHEV $-959,6 \pm 1313,8$ % v/s RHC $-1983,6 \pm 1135,7$ %).

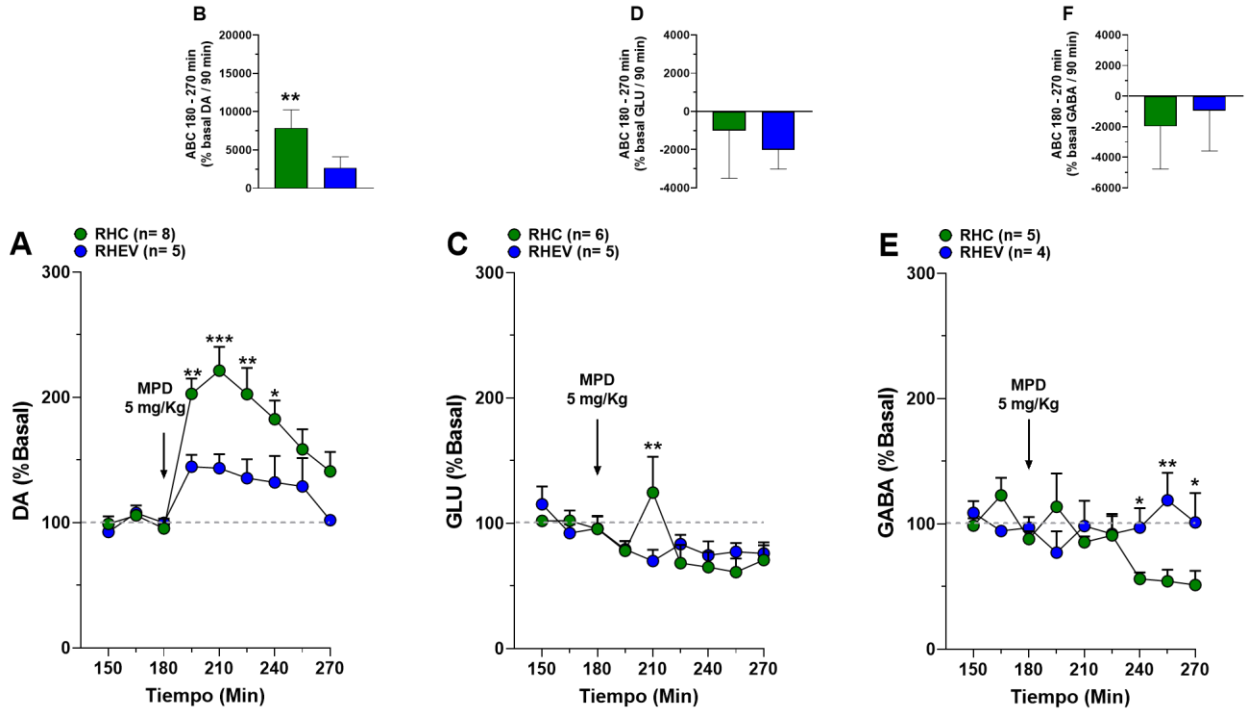


Figura 9. Liberación basal y estimulada de DA, GLU y GABA en NAcc por MPD en hembras. La figura representa la liberación basal y estimulada por una inyección de MPD (5 mg/Kg i.p.) al DPN 60-65 de DA, GLU y GABA (A, C y E respectivamente) y cálculo de ABC considerando los valores de porcentaje de liberación basal de DA, GLU y GABA obtenidos desde los 150 a 270 min (90 min total), luego del estímulo con MPD (B, D y F, respectivamente) en ratas hembra expuestas durante el DPN 1 a aceite de sésamo o EV. El número total de animales utilizados en los grupos experimentales fue de: RHC n=8, RHEV n=5. Los gráficos representan el promedio de % de liberación basal de DA, GLU y GABA \pm error estándar medio. El análisis estadístico para comparar las curvas de curso temporal de liberación de DA, GLU y GABA se realizó utilizando un análisis de varianza two-way ANOVA seguido de un post-test de Fisher's LSD (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Para comparar el ABC se utilizó un análisis t-test (* $p < 0,05$).

7.2.2 Niveles extracelulares de DA, GLU y GABA en NAcc (basales y estimulados por MPD) en ratas macho adultas expuestas neonatalmente a una sola dosis de EV.

En la figura 10A los niveles basales de liberación de DA (desde 0 a 45 min) fueron similares en ambos grupos experimentales (RMC: $99,9 \pm 5,2$ % v/s RMEV: $107,8 \pm 8,7$ %). Sin embargo, al comparar las curvas de liberación temporal de DA inducida por inyección i.p. de 5 mg/kg de MPD se observa un aumento significativo en la liberación de DA a partir del minuto 180 en las ratas control respecto ratas EV (195 min ** $p < 0,0083$, 210 min ** $p < 0,0080$, 225 min ** $p < 0,0017$ y 240 min * $p < 0,0224$). El análisis de ANOVA de dos vías seguido del post-test Fisher's LSD para el gráfico 10A reflejó una interacción [F (8,81) = 2,084; P = 0,0468], tiempo [F (8,81) = 5,510; P < 0,0001] y tratamiento neonatal [F (1,81) = 17,61; P < 0,0001]

significativos. La figura 10B compara el ABC en la liberación de DA obtenida frente a la inyección i.p. de 5 mg/kg de MPD en ratas macho adultas control y EV. Respecto al análisis del ABC (figura 10B) de la liberación porcentual de DA en 90 min se observó diferencias estadísticamente significativas (**p = 0,0049) entre el grupo RMEV (1356,1 ± 895,4 %) v/s RMC (7775,7 ± 1505,5 %).

En la figura 10C la liberación basal de GLU en NAcc no fue diferente entre ambos grupos experimentales (RMC: 102,1 ± 6,3 % v/s RMEV: 100,0 ± 4,8 %). El análisis de ANOVA de dos vías seguido del post-test Fisher's LSD solo mostró una diferencia significativa en la liberación de GLU inducida por la inyección i.p. de 5 mg/kg de MPD en el grupo de ratas hembras control a los 225 min (* p = 0,0192), aunque del análisis de los factores solo fue significativo el tiempo [F (8,81) = 2,619; P = 0,0133], no así en la interacción [F (8,81) = 1,328; P = 0,2415] ni tratamiento neonatal [F (1,81) = 0,7161; P = 0,3999]). Respecto al análisis del ABC (figura 10D) de la liberación porcentual de GLU en 90 min, tampoco se observó una diferencia estadísticamente significativa (RMEV -1340,4 ± 475,1 % v/s RMC -1071,32 ± 719,2 %).

En la figura 10E no se observaron diferencias significativas en la liberación basal de GABA entre ambos grupos experimentales (RMC: 103,5 ± 7,7 % v/s RMEV: 96,7 ± 6,0 %). El análisis de ANOVA de dos vías seguido del post-test Fisher's LSD no mostró una diferencia significativa en la liberación de GABA inducida por la inyección i.p. de 5 mg/kg de MPD (interacción [F (8,54) = 0,6489; P = 0,7332], tiempo [F (8,54) = 1,538; P = 0,1662] y tratamiento neonatal [F (1,54) = 0,3032; P = 0,5841]). Respecto al análisis del ABC (figura 13F) de la liberación porcentual de GABA en 90 min, tampoco se observó una diferencia estadísticamente significativa (RMEV -987,6 ± 592,9 % v/s RMC -1682,8 ± 405,1 %).

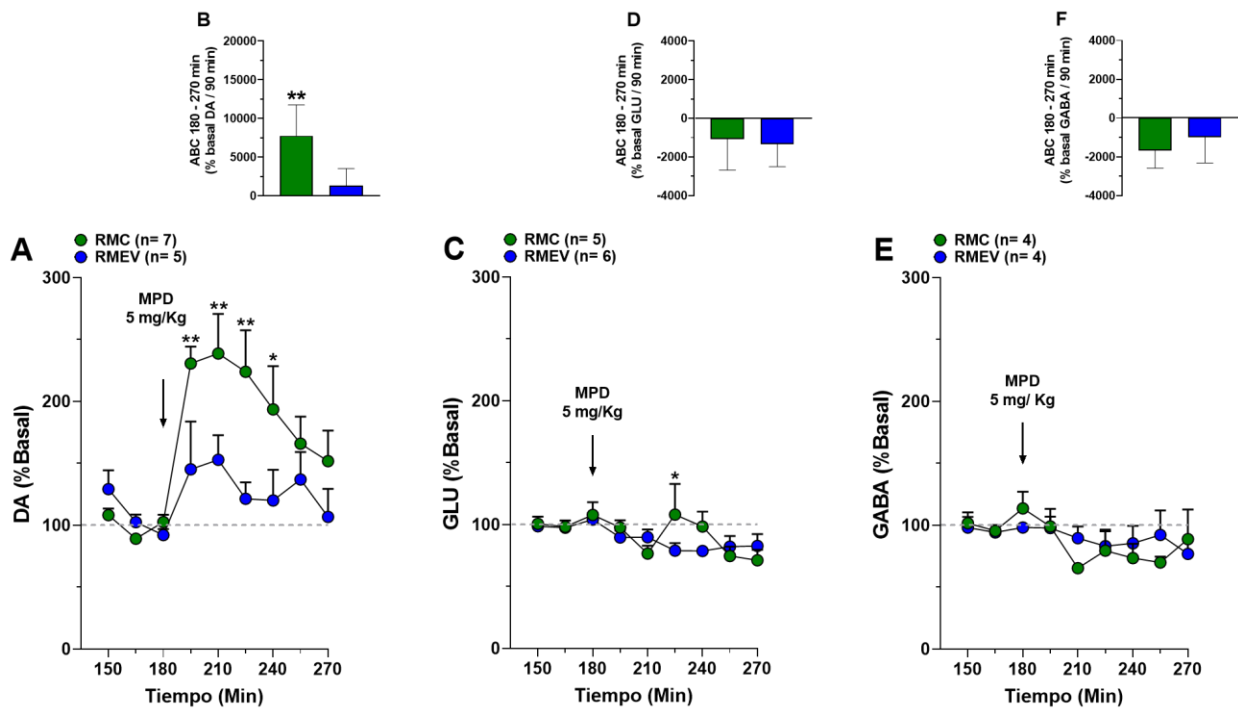


Figura 10. Liberación basal y estimulada de DA, GLU y GABA en NAcc por MPD en machos. La figura representa la liberación basal y estimulada por una inyección de MPD (5 mg/Kg i.p.) al DPN 60-65 de DA, GLU y GABA (A, C y E respectivamente) y cálculo de ABC considerando los valores de porcentaje de liberación basal de DA, GLU y GABA obtenidos desde los 150 a 270 min (90 min total), luego del estímulo con MPD (B, D y F, respectivamente) en ratas macho expuestas durante el DPN 1 a aceite de sésamo o EV. El número total de animales utilizados en los grupos experimentales fue de: RMC n=7, RMEV n=6. Los gráficos representan el promedio de % de liberación basal de DA, GLU y GABA \pm error estándar medio. El análisis estadístico para comparar las curvas de curso temporal de liberación de DA, GLU y GABA se realizó utilizando un análisis de varianza two-way ANOVA seguido de un post-test de Fisher's LSD (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Para comparar el ABC se utilizó un análisis t-test (* $p < 0,05$).

8. Discusión

8.1 Efectos de la reprogramación neonatal con estradiol valerato sobre la liberación de DA, GLU y GABA en NAcc, inducida por activación del receptor D₁ en ratas adultas de ambos sexos.

El desarrollo de este trabajo se basó en el estudio del rol de las hormonas sexuales sobre la modulación de proteínas claves que regulan neurotransmisión dopaminérgica en el sistema mesolímbico. Específicamente, se centró en el NAcc, área implicada directamente en respuestas recompensantes a drogas de abuso [1-5], evaluándose así el efecto de la activación del receptor D₁ sobre la liberación de DA, GLU y GABA en NAcc de ratas macho y hembra con exposición neonatal con EV.

En esta tesis observamos que en ratas hembra EV hubo un aumento significativo en la liberación de DA inducida por la activación del receptor D₁, mientras que en ratas macho, la perfusión del agonista del receptor D₁ produjo un aumento en la liberación de DA en el NAcc de ambos grupos experimentales, pero sin diferencias entre ellos, afirmando así, una diferencia sexual en la liberación de DA inducida por la activación del receptor D₁. Al respecto, existe evidencia que demuestran diferencias relacionadas al sexo, tanto en la actividad como en la densidad de receptores dopaminérgicos en NAcc, teniendo en machos una mayor densidad de receptores D₁ en esta área [76], pero también una mayor sensibilidad en hembras [77], lo que podría estar relacionado con nuestros datos.

Estos cambios en niveles extracelulares de DA producidos por SKF-38393, estarían producidos por una activación de receptores ubicados en las MSN GABAérgicas, puesto que existe evidencia que indica que los receptores D₁ y D₂ dentro del NAcc están segregados en las neuronas mencionadas [21]. Específicamente, los receptores D₁ están localizados sobre neuronas GABAérgicas que proyectan a la sustancia nigra, mientras que D₂ sobre las que proyectan al globo pálido [78]. Además, mediante estudios electrofisiológicos en NAcc, se ha descrito una localización postsináptica para estos receptores respecto a los terminales dopaminérgicos del VTA dentro del NAcc, así como de autorreceptores presinápticos y somato-dendríticos de estas [35, 79].

Por otro lado, utilizando la técnica de optogenética, se demostró que la activación de MSN que poseen D₁, mejoran el condicionamiento de preferencia de lugar (CPP) por cocaína, así como la actividad locomotora inducida por esta droga [30]. Mientras que la inhibición de estas neuronas disminuye ambos efectos conductuales [30, 80]. Esto demostraría un rol importante del receptor D₁ en la respuesta a drogas de abuso y que la exposición neonatal a EV puede ser un factor de vulnerabilidad para la adicción a drogas de abuso en ratas hembra, debido a que genera cambios a largo plazo sobre proteínas claves para la neurotransmisión dopaminérgica en NAcc, observado en el aumento significativo de la liberación extracelular en el grupo de hembras tratadas con EV respecto al control.

Respecto a la liberación de GLU inducida por el agonista D₁ en el NAcc de ratas de ambos sexos y de ambos grupos experimentales (control y EV) no se observaron diferencias significativas. Estos resultados están de acuerdo con la literatura, ya que la perfusión intra-NAcc de SKF-82958 (agonista total para D₁) no produjo cambios significativos en los niveles extracelulares de GLU [81]. Esto nos indicaría que el receptor D₁ no estaría regulando directamente la liberación de GLU en terminales glutamatérgicos del NAcc.

Interesantemente, nuestros resultados muestran que la perfusión de SKF-38393, un agonista para D₁, produjo un aumento en la liberación de GABA en NAcc de ratas control de ambos sexos, relacionándose así con la liberación de DA inducida por el agonista D₁ en NAcc de hembras control. En este contexto, la menor liberación de DA observada en controles post perfusión intra-NAcc de SFK-38393 podría estar mediada por la activación de receptores D₁ ubicados en las MSN, produciendo así una mayor liberación somatodendrítica de GABA en NAcc. Este aumento en los niveles extracelulares de GABA inducidos por el agonismo D₁ en NAcc (ver Fig. 7E y 9E) estaría activando a receptores GABA_B localizados postsinápticamente en terminales dopaminérgicos del NAcc, que llevarían a la inhibición de la liberación de DA observada (ver Fig. 7E y 9E).

El sustento anatómico de esta propuesta se basa en la evidencia que demuestra que neuronas dopaminérgicas mesolímbicas expresan receptores GABA_B en sus terminales [82, 83]. Además, a nivel funcional, experimentos electrofisiológicos han demostrado que la aplicación de baclofeno, un agonista GABA_B, hiperpolariza la membrana de neuronas dopaminérgicas del VTA [84]. Por otro lado, usando la técnica de microdiálisis cerebral en

septum lateral (LS) se demostró que la administración aguda de anfetamina aumenta la liberación de GABA en LS, que a través de la activación del receptor GABA_B inhibe la liberación de DA, mientras que el uso de un antagonista específico GABA_B la restituye [85]. Junto a esto, mediante el uso de gamma vinil-GABA (GVG, Vigabatrint), un inhibidor selectivo e irreversible de GABA-transaminasa (GABA-T) y que potencia la inhibición GABAérgica, no solo bloqueó la adquisición y expresión de CPP por cocaína [86], sino que también inhibió los aumentos de DA extracelular en el NAcc inducidos por cocaína, siendo revertido por SCH-50911 (antagonista de los receptores GABA_B) [87], lo cual relaciona el aumento de los niveles de GABA con la estimulación predominantemente de los receptores de GABA_B, reduciendo así las concentraciones endógenas de DA, tal como se observó también en nuestro resultados.

En conjunto, estos antecedentes y nuestros resultados sugieren que este tipo de receptor GABAérgicos jugaría un papel clave en la modulación del circuito de la recompensa frente a drogas de abuso.

En nuestro modelo de programación neonatal con EV es posible que exista una disminución en la expresión o funcionalidad tanto de los receptores D1 localizado en MSN como de los receptores GABA_B expresados en los terminales dopaminérgicos de NAcc, generando así los cambios observados en la liberación de DA y GABA. Por otro lado, también se ha reportado que en ratas ovariectomizadas la inyección de progesterona aumenta la unión de baclofeno (agonista GABA_B) a los receptores GABA_B en el neocórtex [88]. En este contexto, trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que la administración neonatal de EV disminuye los niveles plasmáticos de progesterona en ratas hembra adultas [73], lo que podría estar asociado a una menor unión de GABA a los receptores GABA_B, que llevaría a disminuir el tono inhibitorio de GABA sobre la liberación de DA en NAcc.

8.2 Efectos de la reprogramación neonatal con hormonas sexuales sobre la liberación de DA, GLU y GABA en NAcc, inducida por el bloqueo de DAT en ratas adultas de ambos sexos.

En una segunda etapa de esta tesis se evaluó el efecto del bloqueo de DAT mediado por la administración sistémica de MPD, sobre la liberación de DA, GLU y GABA en el NAcc de ratas macho y hembras con exposición neonatal a EV. El MPD, conocido comercialmente en nuestro país como Ritalin®, es uno de los medicamentos más comúnmente recetados para el tratamiento del trastorno de déficit atencional con hiperactividad (ADHD) [89]. MPD tiene propiedades estimulantes psicomotoras al igual que la cocaína y la anfetamina, lo que está directamente relacionado con su capacidad para aumentar los niveles extracelulares de DA en áreas como el CE y el NAcc [89]. Específicamente, el MPD inhibe tanto el DAT como el transportador de noradrenalina (NET), aumentando así los niveles de DA y NA en áreas inervadas por ambos neurotransmisores [90]. Además, el DAT tiene un papel crítico en la homeostasis de DA, por lo que la pérdida de su función y regulación ha sido implicada en varias enfermedades relacionadas con la homeostasis dopaminérgica, como esquizofrenia y otros trastornos neuropsiquiátricos [91]. Por otro lado, MDP y otras drogas psicoestimulantes como anfetamina, han sido utilizadas como drogas de abuso [91].

En primer lugar, es necesario mencionar que efectivamente MPD produjo el aumento en los niveles de DA, tanto en machos como en hembras de todos los grupos experimentales, tal como sucede al utilizar otros bloqueadores de la recaptación de DA, como nomifensina o GBR-12909 [32, 34]. Sin embargo, la magnitud de este aumento fue menor en ratas adultas expuestas neonatalmente a EV.

Además, respecto a los resultados obtenidos en ratas hembra, se observó un aumento en la liberación de DA inducida por la administración sistémica de MPD en ambos grupos respecto a sus niveles basales. Sin embargo, en el grupo RHEV se observó un aumento de menor grado que el observado en el grupo de ratas control, esto va de acuerdo a datos de nuestro laboratorio que han demostrado que la administración sistémica de anfetamina (cuyo blanco farmacológico también es DAT) provoca una liberación de DA

significativamente menor en ratas hembras tratadas neonatalmente con EV respecto a ratas hembras control (datos no publicados), lo que se asocia a una menor actividad locomotora inducida por esta droga [71, 73]. A su vez, otros datos no publicados de nuestro laboratorio han demostrado que la preferencia de lugar condicionado (CPP) a anfetamina y MPD es menor en ratas hembra EV versus animales control [73, 74]. Por otro lado, se ha demostrado que tanto la adquisición como la expresión de CPP inducida por cocaína dependen de la actividad de los receptores D1 en NAcc [92, 93], los cuales según nuestros resultados anteriores podrían tener una menor expresión en ratas expuestas neonatalmente a EV. En el mismo sentido, en la literatura se ha demostrado que las hormonas sexuales pueden afectar la expresión y/o funcionalidad de DAT, por ejemplo, la exposición neonatal de roedores a BPA, un disruptor endocrino con actividad estrogénica, produce una reducción significativa de los niveles de la proteína y mRNA de DAT a nivel del cuerpo estriado [94].

Al estudiar la liberación de GLU en NAcc inducida por MPD pudimos observar que no hubo cambios significativos en la cuantía total de este neurotransmisor liberado entre los grupos experimentales. De acuerdo con esto, utilizando el bloqueador de la recaptación de DA, nomifensina, se demostró que la perfusión de esta droga indujo una disminución tardía en los niveles de GLU en NAcc [95], observándose resultados similares a los nuestros. Por lo tanto, parece ser que un aumento en la liberación de GLU fue inhibida por la acción directa de los altos niveles de DA producidas por el bloqueo de DAT [89], sugiriendo una regulación presináptica de la liberación de GLU mediada por DA. Respecto a la liberación de GABA en hembras, se observó que la disminución observada en ratas control fue evitada en ratas hembra EV. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en el ABC de ambos grupos experimentales (figura 11F). Por otro lado, en machos no se apreciaron diferencias significativas entre los grupos control y EV. Estos resultados nos demuestran que los niveles de GABA no son afectados por la administración sistémica de MPD, tal como ha sido observado en otros estudios previamente publicados [96].

Los datos aportados por esta tesis, en primer lugar, refuerzan la idea que el cerebro es un órgano que tempranamente está bajo la influencia de hormonas sexuales, las que

configuran circuitos neuronales y establecen un sustrato neuroquímico para su funcionalidad futura [97]. Esto debido a que efectivamente, una sola dosis de EV administrada en las primeras 12 horas post natales, además de producir cambios en estructuras cerebrales, como el tamaño de la hipófisis (ver anexos 2 y 3), también produjo cambios en los niveles extracelulares de neurotransmisores en NAcc, ya sea aumentando los niveles extracelulares de DA, como disminuyendo los de GABA mediante la modulación del receptor D₁ en ratas hembra.

A su vez, se encontró que la administración neonatal con EV en ratas de ambos sexos durante las primeras 12 horas de vida, disminuye la liberación extracelular de DA inducida por la administración sistémica de metilfenidato respecto al control. Esto nos da paso a establecer que, además, los estrógenos tienen un rol importante en la regulación de proteínas claves que modulan la respuesta a drogas de abuso, ya sea alterando la expresión y/o funcionalidad de estas, como también las interacciones con otras moléculas y neurotransmisores en áreas afines a la recompensa, como es el NAcc.

En este sentido, nuestro modelo de reprogramación neonatal con EV puede estar implicado en cambios a largo plazo de expresión y/o funcionalidad no solo de DAT, conllevando a cambios extracelulares en niveles de DA, sino que también en receptores D₁ localizados en MSN o de los receptores GABA_B expresados en los terminales dopaminérgicos de NAcc, afectando niveles extracelulares de GABA que podrían estar influyendo en la liberación de DA.

Es por ello que este trabajo de tesis aporta nuevos antecedentes que relacionan el rol de un tono GABAérgico sobre los niveles extracelulares de DA en NAcc, así como también sobre la modulación ejercida a largo plazo por los estrógenos sobre circuitos relacionados con la respuesta a drogas de abuso, los que resultan ser blancos para estudios farmacológicos bajo este paradigma o para el estudio de otros moduladores con actividad estrogénica que están en el ambiente y sus consecuencias a largo plazo sobre el sistema de recompensa.

9. Conclusiones

Dentro de los elementos que se pueden concluir de este trabajo de tesis, es que efectivamente, la administración neonatal de EV en ratas hembra aumenta la liberación extracelular de DA inducida por un agonista del receptor D1 respecto al control, ratificando que dicho receptor es modulable por la exposición a estrógenos en períodos críticos del desarrollo. A su vez, también se observan cambios en los niveles extracelulares de GABA en NAcc, disminuyendo, resultando opuestos a los de DA. Esto nos da luces sobre interrelación de estos dos neurotransmisores, pero de manera local a través de los terminales dopaminérgicos que vienen del VTA hacia NAcc, puesto que ya existen antecedentes en la bibliografía sobre una inhibición GABAérgica sobre somas de neuronas dopaminérgicas del VTA que proyectan hacia el área de estudio de este trabajo. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la liberación extracelular de GLU inducido por perfusión de SKF-38393 respecto al control, lo cual permite apoyar parcialmente la hipótesis planteada, debido a que aparentemente los niveles de GLU no influyen, al menos de manera local, los niveles de DA.

Por otro lado, la administración neonatal con EV en ratas hembra disminuye la liberación extracelular de DA inducida por la administración sistémica de metilfenidato respecto al control, demostrando que esta reprogramación neonatal con estradiol modifica proteínas claves en la regulación de la transmisión dopaminérgica, traduciéndose en una disminución del blanco farmacológico de MPD, reduciendo su efecto sobre DAT y apoyando la hipótesis planteada.

Finalmente, experimentos posteriores son necesarios para evaluar si efectivamente se producen alteraciones funcionales y/o de expresión del receptor D1 en las MSN del NAcc de ratas tratadas neonatalmente con EV respecto a ratas controles, junto con evaluar estos mismos parámetros en receptores GABA_B de terminales dopaminérgicos del VTA.

10. Bibliografía

- [1] Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 217-238.
- [2] American Psychiatric Association. (2013). Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5). American Psychiatric Pub.
- [2] Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2016). Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *The Lancet Psychiatry*, 3(8), 760-773.
- [3] Koob, G. F., & Le Moal, M. (1997). Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science*, 278(5335), 52-58.
- [4] Goldstein, R. Z., & Volkow, N. D. (2002). Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *American Journal of Psychiatry*, 159(10), 1642-1652.
- [5] Kalivas, P. W., & Volkow, N. D. (2005). The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *American Journal of Psychiatry*, 162(8), 1403-1413.
- [6] Pfaus, J. G., Damsma, G., Nomikos, G. G., Wenkstern, D. G., Blaha, C. D., Phillips, A. G., & Fibiger, H. C. (1990). Sexual behavior enhances central dopamine transmission in the male rat. *Brain research*, 530(2), 345-348.
- [7] Bassareo, V., & Di Chiara, G. (1997). 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. *Journal of Neuroscience*, 17(2), 851-861.
- [8] Palmiter, R. D. (2007). Is dopamine a physiologically relevant mediator of feeding behavior?. *Trends in neurosciences*, 30(8), 375-381.
- [9] Frohmader, K. S., Pitchers, K. K., Balfour, M. E., & Coolen, L. M. (2010). Mixing pleasures: review of the effects of drugs on sex behavior in humans and animal models. *Hormones and Behavior*, 58(1), 149-162.
- [10] Solomon, R. L., & Corbit, J. D. (1974). An opponent-process theory of motivation: I. Temporal dynamics of affect. *Psychological review*, 81(2), 119.
- [11] Di Chiara, G., & Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(14), 5274-5278.
- [12] Volkow, N. D., & Morales, M. (2015). The brain on drugs: from reward to addiction. *Cell*, 162(4), 712-725.

- [13] Volkow, N. D., & Baler, R. D. (2014). Addiction science: Uncovering neurobiological complexity. *Neuropharmacology*, 76, 235-249.
- [14] Freund, T. F., Powell, J. F., & Smith, A. D. (1984). Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neuroscience*, 13(4), 1189-1215.
- [15] Levitt, M., Spector, S., Sjoerdsma, A., & Udenfriend, S. (1965). Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 148(1), 1-8.
- [16] Nagatsu, T., Levitt, M., & Udenfriend, S. (1964). Tyrosine hydroxylase the initial step in norepinephrine biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 239(9), 2910-2917.
- [17] Elsworth, J. D., & Roth, R. H. (1997). Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: relevance to gene therapy of Parkinson's disease. *Experimental neurology*, 144(1), 4-9.
- [18] Campusano, J. M., Abarca, J., Forray, M. I., Gysling, K., & Bustos, G. (2002). Modulation of dendritic release of dopamine by metabotropic glutamate receptors in rat substantia nigra. *Biochemical pharmacology*, 63(7), 1343-1352.
- [19] Baik, J. H. (2013). Dopamine signaling in reward-related behaviors. *Frontiers in neural circuits*, 7, 152.
- [20] Beaulieu, J. M., & Gainetdinov, R. R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological reviews*, 63(1), 182-217.
- [21] Tritsch, N. X., & Sabatini, B. L. (2012). Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. *Neuron*, 76(1), 33-50.
- [22] Hetey, L., Kudrin, V. S., Shemanow, A. Y., Rayevsky, K. S., & Oelssner, W. (1985). Presynaptic dopamine and serotonin receptors modulating tyrosine hydroxylase activity in synaptosomes of the nucleus accumbens of rats. *European journal of pharmacology*, 113(1), 1-10.
- [23] Cooper, J. R., Bloom, F. E., & Roth, R. H. (2003). *The biochemical basis of neuropharmacology*. Oxford University Press, USA.
- [24] Arias-Carrión, O., Caraza-Santiago, X., Salgado-Licon, S., Salama, M., Machado, S., Nardi, A. E., ... & Murillo-Rodríguez, E. (2014). Orquestic regulation of neurotransmitters on reward-seeking behavior. *International archives of medicine*, 7(1), 1-15.
- [25] Björklund, A., & Dunnett, S. B. (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends in neurosciences*, 30(5), 194-202.
- [26] Fuxe, K. (1965). Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. IV The distribution of monoamine terminals in the central nervous system. *Acta physiol scand*, 247, 39-85.

- [27] Bahena-Trujillo, R., Flores, G., & Arias-Montaña, J. A. (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Revista Biomédica*, 11(1), 39-60.
- [28] Wise, R. A. (2009). Roles for nigrostriatal—not just mesocorticolimbic—dopamine in reward and addiction. *Trends in neurosciences*, 32(10), 517-524.
- [29] Enoksson, Bertran-Gonzalez & Christie, S., & Kaplitt, M. G. (2015). The nucleus accumbens: a comprehensive review. *Stereotactic and functional neurosurgery*, 93(2), 75-93.
- [30] Lobo, M. K., Covington, H. E., Chaudhury, D., Friedman, A. K., Sun, H., Damez-Werno, D., ... & Mouzon, E. (2010). Cell type-specific loss of BDNF signaling mimics optogenetic control of cocaine reward. *Science*, 330(6002), 385-390.
- [31] Schultz, W. (2002). Getting formal with dopamine and reward. *Neuron*, 36(2), 241-263.
- [32] Montaña, J. A. A., Martínez-Fong, D., & Aceves, J. (1992). GABAB receptor activation partially inhibits N-methyl-D-aspartate-mediated tyrosine hydroxylase stimulation in rat striatal slices. *European journal of pharmacology*, 218(2-3), 335-338.
- [33] Kalivas, P. W., & Duffy, P. (1991). A comparison of axonal and somatodendritic dopamine release using in vivo dialysis. *Journal of neurochemistry*, 56(3), 961-967.
- [34] Kohl, R. R., Katner, J. S., Chernet, E., & McBride, W. J. (1998). Ethanol and negative feedback regulation of mesolimbic dopamine release in rats. *Psychopharmacology*, 139(1-2), 79-85.
- [35] Rahman, S., & McBride, W. J. (2000). Feedback control of mesolimbic somatodendritic dopamine release in rat brain. *Journal of neurochemistry*, 74(2), 684-692.
- [36] Rahman, S., & McBride, W. J. (2001). D1–D2 dopamine receptor interaction within the nucleus accumbens mediates long-loop negative feedback to the ventral tegmental area (VTA). *Journal of neurochemistry*, 77(5), 1248-1255.
- [37] Lobo, M. K., & Nestler, E. J. (2011). The striatal balancing act in drug addiction: distinct roles of direct and indirect pathway medium spiny neurons. *Frontiers in neuroanatomy*, 5, 41.
- [38] Nakajima, S., & O'Regan, N. B. (1991). The effects of dopaminergic agonists and antagonists on the frequency-response function for hypothalamic self-stimulation in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 39(2), 465-468.
- [39] Gilliss, B., Malanga, C., Pieper, J. O., & Carlezon, W. A. (2002). Cocaine and SKF-82958 potentiate brain stimulation reward in Swiss-Webster mice. *Psychopharmacology*, 163(2), 238-248.
- [40] Brennan, K. A., Carati, C., Lea, R. A., Fitzmaurice, P. S., & Schenk, S. (2009). Effect of D1-like and D2-like receptor antagonists on methamphetamine and 3, 4-methylenedioxymethamphetamine self-administration in rats. *Behavioural pharmacology*, 20(8), 688-694.

- [41] Barrett, A. C., Miller, J. R., Dohrmann, J. M., & Caine, S. B. (2004). Effects of dopamine indirect agonists and selective D1-like and D2-like agonists and antagonists on cocaine self-administration and food maintained responding in rats. *Neuropharmacology*, 47, 256-273.
- [42] Bari, A. A., & Pierce, R. C. (2005). D1-like and D2 dopamine receptor antagonists administered into the shell subregion of the rat nucleus accumbens decrease cocaine, but not food, reinforcement. *Neuroscience*, 135(3), 959-968.
- [43] Caine, S. B., Heinrichs, S. C., Coffin, V. L., & Koob, G. F. (1995). Effects of the dopamine D-1 antagonist SCH 23390 microinjected into the accumbens, amygdala or striatum on cocaine self-administration in the rat. *Brain research*, 692(1-2), 47-56.
- [44] Baker, D. A., Fuchs, R. A., Specio, S. E., Khroyan, T. V., & Neisewander, J. L. (1998). Effects of intraaccumbens administration of SCH-23390 on cocaine-induced locomotion and conditioned place preference. *Synapse*, 30(2), 181-193.
- [45] Young, E. A., Dreumont, S. E., & Cunningham, C. L. (2014). Role of nucleus accumbens dopamine receptor subtypes in the learning and expression of alcohol-seeking behavior. *Neurobiology of learning and memory*, 108, 28-37.
- [46] Stairs, D. J., Neugebauer, N. M., & Bardo, M. T. (2010). Nicotine and cocaine self-administration using a multiple schedule of intravenous drug and sucrose reinforcement in rats. *Behavioural pharmacology*, 21(3), 182.
- [47] Caine, S. B., & Koob, G. F. (1994). Effects of dopamine D-1 and D-2 antagonists on cocaine self-administration under different schedules of reinforcement in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 270(1), 209-218.
- [48] Hoffman, D. C., & Beninger, R. J. (1989). The effects of selective dopamine D1 or D2 receptor antagonists on the establishment of agonist-induced place conditioning in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 33(2), 273-279.
- [49] White, N. M., Packard, M. G., & Hiroi, N. (1991). Place conditioning with dopamine D1 and D2 agonists injected peripherally or into nucleus accumbens. *Psychopharmacology*, 103(2), 271-276.
- [50] Graham, D. L., Hoppenot, R., Hendryx, A., & Self, D. W. (2007). Differential ability of D1 and D2 dopamine receptor agonists to induce and modulate expression and reinstatement of cocaine place preference in rats. *Psychopharmacology*, 191(3), 719-730.
- [51] Guyton, A., & Hall, J. (2016). *Tratado de fisiología médica* (13^o ed.). (pp. 2234-2257). España: Elsevier.
- [52] Simerly, R. B., Swanson, L. W., Chang, C., & Muramatsu, M. (1990). Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *Journal of Comparative Neurology*, 294(1), 76-95.

- [53] Shughrue, P. J., Lane, M. V., & Merchenthaler, I. (1997). Comparative distribution of estrogen receptor- α and- β mRNA in the rat central nervous system. *Journal of Comparative Neurology*, 388(4), 507-525.
- [54] McEwen, B. S., & Alves, S. E. (1999). Estrogen actions in the central nervous system. *Endocrine reviews*, 20(3), 279-307.
- [55] Ramirez, V. D., & Zheng, J. (1996). Membrane sex-steroid receptors in the brain. *Frontiers in neuroendocrinology*, 17(4), 402-439.
- [56] Wierman, M. E. (2007). Sex steroid effects at target tissues: mechanisms of action. *Advances in physiology education*, 31(1), 26-33.
- [57] Xiao, L., & Becker, J. B. (1994). Quantitative microdialysis determination of extracellular striatal dopamine concentration in male and female rats: effects of estrous cycle and gonadectomy. *Neuroscience letters*, 180(2), 155-158.
- [58] Becker, J. B., & Hu, M. (2008). Sex differences in drug abuse. *Frontiers in neuroendocrinology*, 29(1), 36-47.
- [59] Sotomayor-Zárate, R., Cruz, G., M Renard, G., Espinosa, P., & D Ramirez, V. (2014). Sex hormones and brain dopamine functions. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents)*, 14(2), 62-71.
- [60] Bossé, R., Rivest, R., & Di Paolo, T. (1997). Ovariectomy and estradiol treatment affect the dopamine transporter and its gene expression in the rat brain. *Molecular Brain Research*, 46(1-2), 343-346.
- [61] Chavez, C., Hollaus, M., Scarr, E., Pavey, G., Gogos, A., & van den Buuse, M. (2010). The effect of estrogen on dopamine and serotonin receptor and transporter levels in the brain: an autoradiography study. *Brain research*, 1321, 51-59.
- [62] Lammers, C. H., D'Souza, U., Qin, Z. H., Lee, S. H., Yajima, S., & Mouradian, M. M. (1999). Regulation of striatal dopamine receptors by estrogen. *Synapse*, 34(3), 222-227.
- [63] Filardo, E. J., Quinn, J. A., Frackelton Jr, A. R., & Bland, K. I. (2002). Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Molecular endocrinology*, 16(1), 70-84.
- [64] Lucas, A. (1991). Programming by early nutrition in man. *The childhood environment and adult disease*, 1991, 38-55.
- [65] Ravizza, T., Velíšková, J., & Moshe, S. L. (2003). Testosterone regulates androgen and estrogen receptor immunoreactivity in rat substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience letters*, 338(1), 57-61.

- [66] Creutz, L. M., & Kritzer, M. F. (2004). Mesostriatal and mesolimbic projections of midbrain neurons immunoreactive for estrogen receptor beta or androgen receptors in rats. *Journal of Comparative Neurology*, 476(4), 348-362.
- [67] Johnson, M. L., Ho, C. C., Day, A. E., Walker, Q. D., Francis, R., & Kuhn, C. M. (2010). Oestrogen receptors enhance dopamine neurone survival in rat midbrain. *Journal of neuroendocrinology*, 22(4), 226-237.
- [68] K hasnavis, S., Ghosh, A., Roy, A., & Pahan, K. (2013). Castration induces Parkinson disease pathologies in young male mice via inducible nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 288(29), 20843-20855.
- [69] Sotomayor-Zárate, R., Tiszavari, M., Cruz, G., & Lara, H. E. (2011). 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*, 96(6), 1490-1496.
- [70] Sotomayor-Zárate, R., Cruz, G., M Renard, G., Espinosa, P., & D Ramirez, V. (2014). Sex hormones and brain dopamine functions. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents)*, 14(2), 62-71.
- [71] Cruz, G., Riquelme, R., Espinosa, P., Jara, P., Dagnino-Subiabre, A., Renard, G. M., & Sotomayor-Zárate, R. (2014). Neonatal exposure to estradiol valerate increases dopamine content in nigrostriatal pathway during adulthood in the rat. *Horm Metab Res*, 46(5), 322-327.
- [72] Bonansco, C., Martínez-Pinto, J., Silva, R. A., Velásquez, V. B., Martorell, A., Selva, M. V., ... & Sotomayor-Zárate, R. (2018). Neonatal exposure to oestradiol increases dopaminergic transmission in nucleus accumbens and morphine-induced conditioned place preference in adult female rats. *Journal of neuroendocrinology*, 30(7), e12574.
- [73] Espinosa, P., Silva, R. A., Sanguinetti, N. K., Venegas, F. C., Riquelme, R., González, L. F., ... & Sotomayor-Zárate, R. (2016). Programming of dopaminergic neurons by neonatal sex hormone exposure: effects on dopamine content and tyrosine hydroxylase expression in adult male rats. *Neural plasticity*, 2016.
- [74] Dib, T., Martínez-Pinto, J., Reyes-Parada, M., Torres, G. E., & Sotomayor-Zárate, R. (2017). Neonatal programming with testosterone propionate reduces dopamine transporter expression in nucleus accumbens and methylphenidate-induced locomotor activity in adult female rats. *Behavioural brain research*.
- [75] Paxinos, G., & Watson, C. (2006). *The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition*. Elsevier.
- [76] Andersen, S. L., & Teicher, M. H. (2000). Sex differences in dopamine receptors and their relevance to ADHD. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 24(1), 137-141.

- [77] Festa, E. D., Jenab, S., Weiner, J., Nazarian, A., Niyomchai, T., Russo, S. J., ... & Quinones-Jenab, V. (2006). Cocaine-induced sex differences in D1 receptor activation and binding levels after acute cocaine administration. *Brain research bulletin*, 68(4), 277-284.
- [78] Saklayen, S. S., Mabrouk, O. S., & Pehek, E. A. (2004). Negative feedback regulation of nigrostriatal dopamine release: mediation by striatal D1 receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 311(1), 342-348.
- [79] White, F. J., & Wang, R. Y. (1986). Electrophysiological evidence for the existence of both D-1 and D-2 dopamine receptors in the rat nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience*, 6(1), 274-280.
- [80] Hikida, T., Kimura, K., Wada, N., Funabiki, K., & Nakanishi, S. (2010). Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. *Neuron*, 66(6), 896-907.
- [81] Kalivas, P. W., & Duffy, P. (1997). Dopamine regulation of extracellular glutamate in the nucleus accumbens. *Brain research*, 761(1), 173-177.
- [82] Wirtshafter, D., & Sheppard, A. C. (2001). Localization of GABAB receptors in midbrain monoamine containing neurons in the rat. *Brain research bulletin*, 56(1), 1-5.
- [83] Ciccarelli, A., Calza, A., Panzanelli, P., Concas, A., Giustetto, M., & Sassoè-Pognetto, M. (2012). Organization of GABAergic synaptic circuits in the rat ventral tegmental area. *PloS one*, 7(10).
- [84] Mueller, A. L., & Brodie, M. S. (1989). Intracellular recording from putative dopamine-containing neurons in the ventral tegmental area of Tsai in a brain slice preparation. *Journal of neuroscience methods*, 28(1-2), 15-22.
- [85] Sotomayor-Zárate, R., Araya, K. A., Pereira, P., Blanco, E., Quiroz, G., Pozo, S., ... & Gysling, K. (2010). Activation of GABA-B receptors induced by systemic amphetamine abolishes dopamine release in the rat lateral septum. *Journal of neurochemistry*, 114(6), 1678-1686.
- [86] Dewey, S. L., Morgan, A. E., Ashby Jr, C. R., Horan, B., Kushner, S. A., Logan, J., ... & Brodie, J. D. (1998). A novel strategy for the treatment of cocaine addiction. *Synapse*, 30(2), 119-129.
- [87] Ashby Jr, C. R., Rohatgi, R., Ngosuwan, J., Borda, T., Gerasimov, M. R., Morgan, A. E., ... & Dewey, S. L. (1999). Implication of the GABA_B receptor in gamma vinyl-GABA's inhibition of cocaine-induced increases in nucleus accumbens dopamine. *Synapse*, 31(2), 151-153.
- [88] Al-Dahan, M. I., & Thalman, R. H. (1996). Progesterone regulates gamma-aminobutyric acid B (GABAB) receptors in the neocortex of female rats. *Brain research*, 727(1-2), 40-48.
- [89] Woods, S. K., & Meyer, J. S. (1991). Exogenous tyrosine potentiates the methylphenidate-induced increase in extracellular dopamine in the nucleus accumbens: a microdialysis study. *Brain research*, 560(1-2), 97-105.

- [90] Shimizu, R., Horiguchi, N., Yano, K., Sakuramoto, M., Kanegawa, N., Shinohara, S., & Ohnishi, S. (2019). Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling of Brain Dopamine Levels based on Dopamine Transporter Occupancy after Administration of Methylphenidate in Rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 369(1), 78-87.
- [91] McHugh, P. C., & Buckley, D. A. (2015). The structure and function of the dopamine transporter and its role in CNS diseases. In *Vitamins & Hormones* (Vol. 98, pp. 339-369). Academic Press.
- [92] Galaj, E., Ewing, S., & Rinaldi, R. (2018). Dopamine D1 and D3 receptor polypharmacology as a potential treatment approach for substance use disorder. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 89, 13-28.
- [93] Hikida, T., Yawata, S., Yamaguchi, T., Danjo, T., Sasaoka, T., Wang, Y., & Nakanishi, S. (2013). Pathway-specific modulation of nucleus accumbens in reward and aversive behavior via selective transmitter receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(1), 342-347.
- [94] Ishido, M., Yonemoto, J., & Morita, M. (2007). Mesencephalic neurodegeneration in the orally administered bisphenol A-caused hyperactive rats. *Toxicology letters*, 173(1), 66-72.
- [95] You, Z. B., Chen, Y. Q., & Wise, R. A. (2001). Dopamine and glutamate release in the nucleus accumbens and ventral tegmental area of rat following lateral hypothalamic self-stimulation. *Neuroscience*, 107(4), 629-639.
- [96] Hernandez, L. F., Segovia, G., & Mora, F. (2008). Chronic treatment with a dopamine uptake blocker changes dopamine and acetylcholine but not glutamate and GABA concentrations in prefrontal cortex, striatum and nucleus accumbens of the awake rat. *Neurochemistry international*, 52(3), 457-469.
- [97] Bayless, D. W., & Shah, N. M. (2016). Genetic dissection of neural circuits underlying sexually dimorphic social behaviours. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1688), 20150109.

11. Anexos

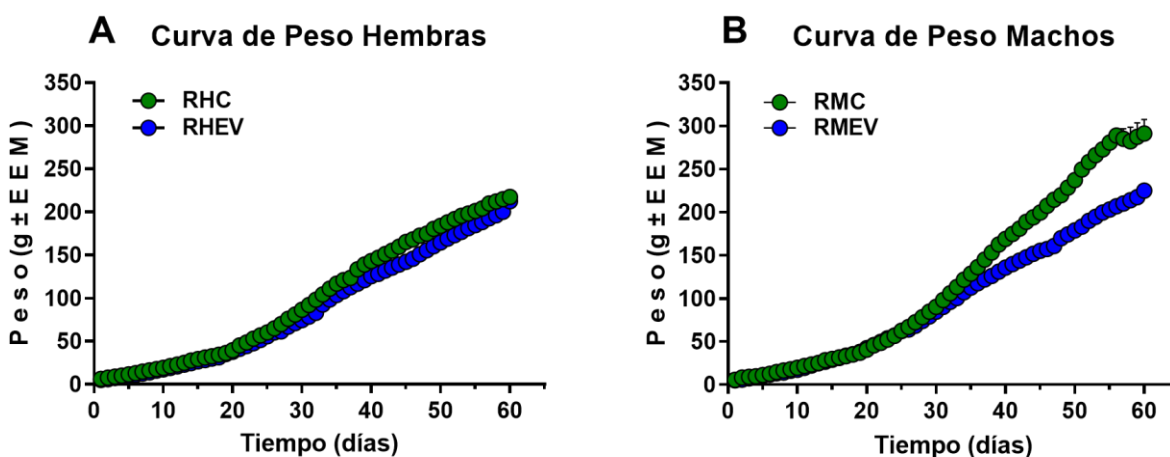
11.1 Caracterización del modelo de estrogenización neonatal: Curvas de peso y parámetros de función reproductiva.

11.1.1 Curvas de Peso

El peso corporal de los animales fue registrado para establecer curvas de ganancia de peso de ratas hembras y machos inyectados durante el DPN 1 con aceite de sésamo (RHC: ratas hembras control, RMC: ratas machos control) y EV (RHEV: ratas hembras EV, RMEV: ratas machos EV) para que pudiesen ser comparadas por tratamiento neonatal. Se encontró diferencias estadísticamente significativas en las curvas de peso entre los grupos experimentales según sexo (anexo 1).

En el anexo 1A se observan diferencias estadísticamente significativas entre las ratas hembra al comparar las curvas de peso entre RHC y RHEV (Interacción: $***P < 0,0001$; Tiempo: $****P < 0,0001$ y también en el Tratamiento: $P < 0,0001$).

En el anexo 1B se observan diferencias estadísticamente significativas entre las ratas machos al comparar las curvas de peso entre RMC y RMEV (Interacción: $****P < 0,0001$; Tiempo: $****P < 0,0001$ y Tratamiento: $****P < 0,0001$).



Anexo 1. Curvas de ganancia de peso de ratas hembras (A) y ratas machos (B) inyectados durante el DPN 1 con aceite de sésamo o EV. El número de animales utilizados para los grupos experimentales fue de: RHC n=13, RHEV n=14, RMC n=10, RMEV n=12. Los valores representados en el gráfico representan el promedio de peso (mg) \pm error estándar medio. Se realizó un análisis de varianza two-way ANOVA seguido de un post-test de Fisher's LSD ($*p < 0,05$).

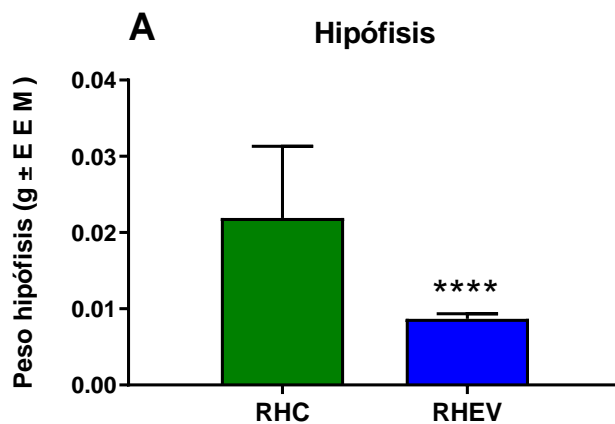
11.1.1 Peso de tejidos sensibles a la acción de hormonas sexuales en ratas hembra adultas.

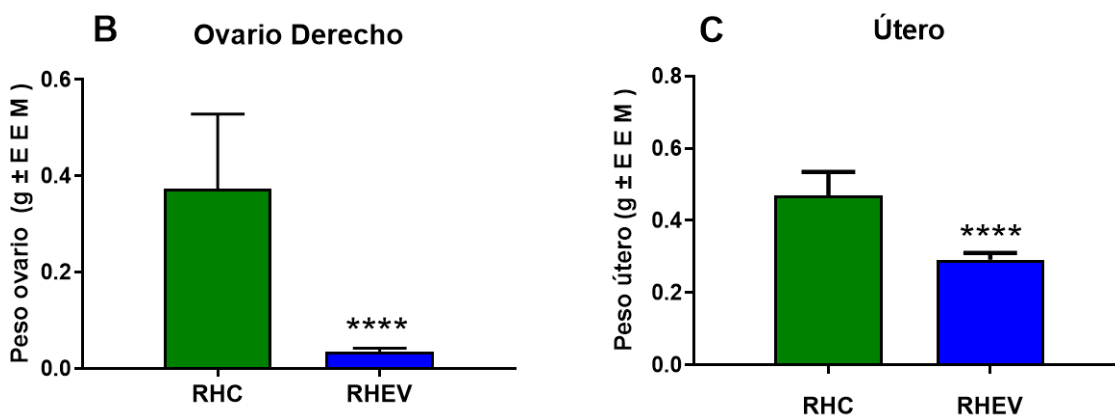
La administración neonatal de EV produjo cambios en el peso de tejidos sensibles a la acción de las hormonas sexuales, como ovarios, útero e hipófisis en hembras (ver anexo 2).

En el anexo 2A se observan diferencias estadísticamente significativas entre las ratas hembras al comparar el peso de hipófisis. Se evidenció una disminución del peso de esta glándula (**** $P < 0,0001$) en RHEV ($8,67 \pm 0,67$ mg) respecto de las RHC ($21,92 \pm 9,38$ mg).

En el anexo 2B se observan diferencias estadísticamente significativas entre las ratas hembras al comparar el peso del ovario derecho. Se evidenció una disminución del peso de las gónadas (**** $p < 0,0001$) en RHEV ($34,95 \pm 7,16$ mg) respecto de las RHC ($372,96 \pm 155,9$ mg).

En el gráfico 2C se observan diferencias estadísticamente significativas entre las ratas hembras al comparar el peso del útero. Se evidenció una disminución del peso de este órgano (**** $p < 0,0001$) en RHEV ($184,10 \pm 11,88$ mg) respecto de las RHC ($470,60 \pm 64,38$ mg).





Anexo 2. Peso de los órganos sensibles a la acción de hormonas sexuales considerando a hipófisis (A), ovario derecho (B) y útero (C) al DPN 60-65 en ratas hembras expuestas durante el DPN 1 a aceite de sésamo, EV o TP. El número de animales utilizados para los grupos experimentales fue de: RHC n=13, RHEV n=14 y RHTP n=9. Los valores representados en el gráfico representan el promedio de peso (mg) ± error estándar medio. Se realizó un análisis de varianza one-way ANOVA seguido de un post-test de Fisher's LSD (*p<0,05).

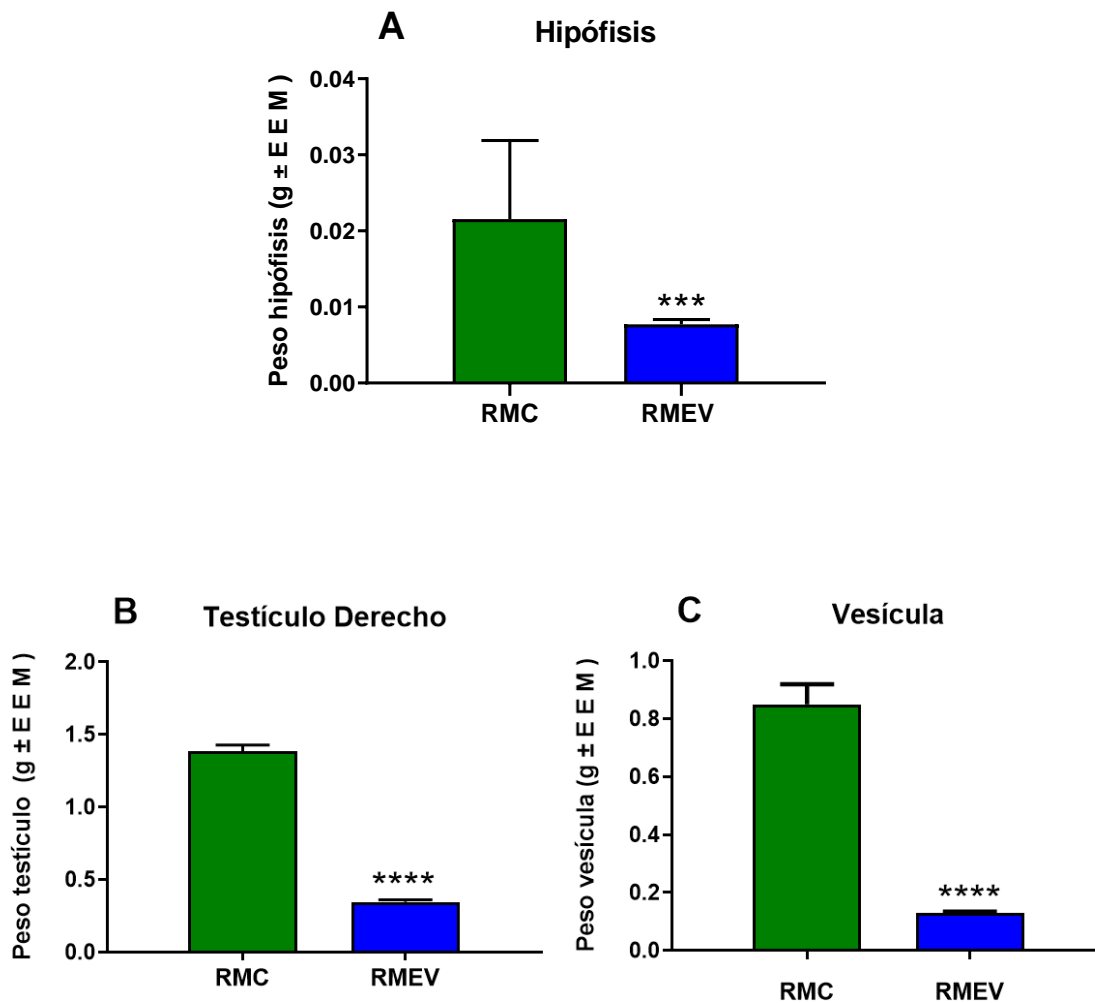
11.1.2 Peso de tejidos sensibles a la acción de hormonas sexuales en ratas macho adultos.

Al igual que en las ratas hembras la administración neonatal de EV produjo cambios en el peso de tejidos sensibles a la acción de las hormonas sexuales, como hipófisis, testículo derecho y vesícula seminal en machos (ver anexo 3).

En el anexo 3A se observan diferencias que resultaron estadísticamente significativas entre las ratas machos al comparar el peso de hipófisis. Se evidenció una disminución del peso de esta glándula (***P = 0,0005) en RMEV (7,71 ± 0,63 mg).

En el anexo 3B se observan diferencias que resultaron estadísticamente significativas entre las ratas machos al comparar el peso del testículo derecho. Se evidenció una disminución del peso de las gónadas (****p < 0,0001) en RMEV (347,38 ± 42,40 mg) respecto al grupo RMC (1388,03 ± 40,72 mg).

En el anexo 3C se observan diferencias estadísticamente significativas entre las ratas machos al comparar el peso de la vesícula seminal. Se evidenció una disminución del peso de esta glándula (****p<0,0001) en RMEV (129,56 ± 13,32 mg) respecto de los RMC (850,69 ± 68,89 mg).



Anexo 3. Peso de los órganos sensibles a la acción de hormonas sexuales considerando a hipófisis (A), testículo derecho (B) y vesícula seminal (C) al DPN 60-65 en ratas machos expuestas durante el DPN 1 a aceite de sésamo, EV o TP. El número de animales utilizados para los grupos experimentales fue de: RMC n=10, RMEV n=12, RMTP n=8. Los valores representados en el gráfico representan el promedio de peso (mg) ± error estándar medio. Se realizó un análisis de varianza one-way ANOVA seguido de un post-test de Fisher's LSD (*p<0,05).

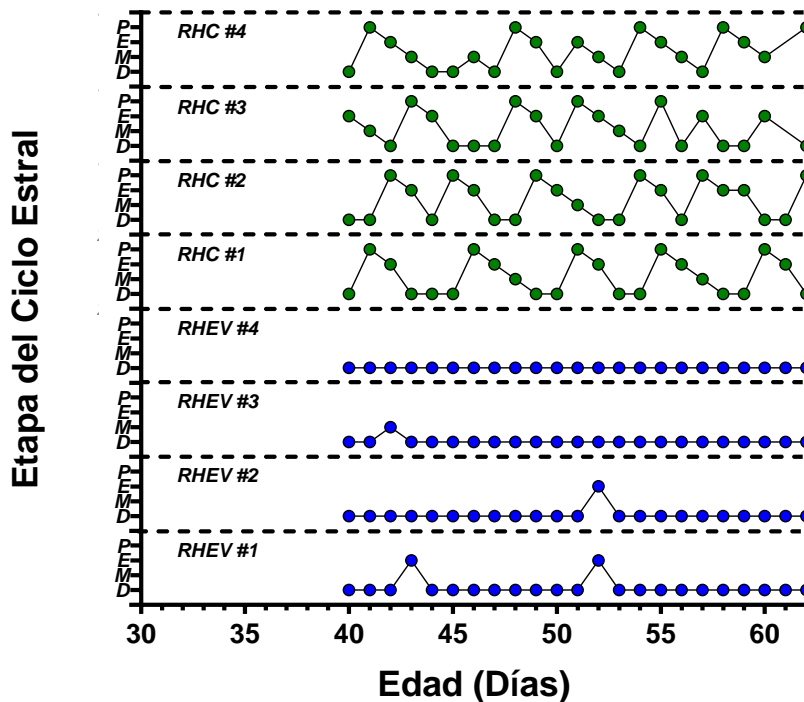
11.1.2 Efectos sobre la Ciclicidad Estral en Ratas Hembra Controles y Estrogenizadas

La actividad cíclica estral es otro parámetro analizado como control interno, ya que se ha demostrado que la administración neonatal de hormonas sexuales modula el ciclo estral [53, 61], por lo cual se decidió estudiar la ciclicidad estral en ratas hembras entre el DPN 40 y DPN 60-62 (ver anexo 4).

En el anexo 4 se observa que la administración neonatal de aceite de sésamo no afectó la actividad cíclica estral en RHC (registrándose ciclos con un período normal de 4 a 5 días), mientras que la administración neonatal de EV produjo una aciclicidad estral que es característica de este tipo de tratamiento.

Estos resultados validan el protocolo experimental de exposición neonatal a hormonas sexuales utilizado.

Hembras Control v/s EV



Anexo 4. Actividad cíclica estral desde el DPN 40 al DPN 60-62 en ratas hembras expuestas durante el DPN 1 a aceite de sésamo o EV. Se comparan los ciclos estrales representativos de 4 RHC (círculos verdes) versus 4 RHEV (círculos azules). D: diestro, M: metaestro, E: estro, P: proestro.